



ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE

Daouda Toure

► To cite this version:

Daouda Toure. ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE. Chimie organique. Université Felix Houphoeut Boigny, Côte d'Ivoire, 2015. Français. NNT : 29/2015 . tel-01222964

HAL Id: tel-01222964

<https://theses.hal.science/tel-01222964>

Submitted on 31 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE



SCIENCES MEDICALES ABIDJAN

Année Universitaire
2013-2014

N° d'ordre : 29 / 2015

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
L'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY
En Biologie Humaine Tropicale

Spécialité : Biochimie
Option : Chimie- Biologie

M. TOURE Daouda

ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE

Présentée et soutenue publiquement le 15 Janvier 2015 devant le jury composé de :

Mme KACOU N'DOUBA Adèle,
M. DJAMAN Allico Joseph,
M. BEDI Gustave,
M. KATTIE Aka Louka,
M. SISSOUMA Drissa,
M. OUATTARA Mahama,
Mme GUESSENND Nathalie,

Professeur Titulaire UFR/SM
Professeur Titulaire UFR/BIOS
Maître de Conférences
Professeur Titulaire UFR/IOS
Maître de Conférences UFR/SSMT
Maître de Conférences Ag. UFR/SPB
Maître de Recherches UFR/SM

UFHB Président
UFHB Directeur
ENS Co-Directeur
UFHB Rapporteur
UFHB Rapporteur
UFHB Examineur
UFHB Examineur

REMERCIEMENTS

Ces travaux de recherche ont été réalisés grâce au Laboratoire de Biochimie et de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), et au Laboratoire de Chimie Organique Biologique (LCOB) de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan. Ce travail s'inscrit dans le cadre du vaste projet de valorisation scientifique de plantes médicinales. Cette approche permettra sûrement de découvrir de nouvelles molécules actives, à prix certainement abordables et dont les propriétés biochimiques, pharmacologiques et toxicologiques sont connues.

Je remercie Professeurs DOSSO Mireille et TONZIBO Félix, respectivement Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et du Laboratoire de Chimie Organique Biologique de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan qui ont bien voulu m'accepter dans leur équipe pour la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier Professeur DJAMAN Joseph, qui a accepté de diriger cette thèse, en m'acceptant dans son équipe de recherche. Monsieur le Directeur, vos conseils et orientations m'ont permis de mener à bien cette passionnante étude à vos côtés. Je voudrais que vous acceptiez mes remerciements les plus sincères que je voudrais formuler à votre endroit.

Je voudrais particulièrement remercier Docteur Gustave BEDI, Maître de Conférences, initiateur de ce projet de recherche. En effet, ces travaux sont le fruit d'un programme de recherche qui a pris son origine au laboratoire de chimie organique structurale et axé sur l'étude des principes actifs des plantes aromatiques médicinales. En vue de confirmer les activités biologiques de ces composés, il a été nécessaire de s'adresser à un laboratoire de microbiologie. C'est ainsi que la thèse a été logée au laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur afin que je puisse, moi biochimique de formation, faire la chimie et compléter les résultats en biologie. Docteur Gustave BEDI, le co-directeur de cette thèse, m'a inculqué les méthodes de la recherche en Phytochimie et en chimie préparative qui a constitué la grande partie du travail. Sa rigueur et ses qualités scientifiques m'ont permis de m'initier aux grandes techniques de séparation et de disposer de composés à soumettre aux tests antimicrobiens. Veuillez accepter cher Maître, mes sincères remerciements.

Toute ma reconnaissance Professeur KACOU N'DOUBA Adèle en acceptant la présidence de ce jury de thèse. Notre rencontre remonte depuis le DEA. C'est un honneur et un immense plaisir que de présenter ce travail devant vous. C'est bien vous qui m'avez appris à faire mes premiers pas en Bactériologie et mon initiation à la recherche. Le parcours a été semé d'embûches mais j'y suis. Merci à vous une fois de plus.

Je remercie Professeur KATTIE AKA Louka. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Docteur SISSOUMA Drissa, Maître de Conférences à l'UFR des Sciences et Structures de la matière. Mon admiration pour vous remonte depuis la deuxième année de mon cycle universitaire. Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Vos avis et recommandations ont contribué à améliorer notre travail. Soyez en remercier.

Je tiens à remercier Docteur GUESSENND Nathalie, Maître de Recherche à l'UFHB et Chercheur-Associé à l'IPCI pour ses sages conseils lors de l'exécution du volet bactériologique de ce projet. Vos conseils et encouragements ne m'ont jamais fait défaut tout au long de ce travail. Merci pour votre disponibilité. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie Docteur OUATTARA Mahama, Maître de Conférences Agrégé à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques pour sa disponibilité. Vos remarques et suggestions ont participé à l'amélioration de ce document. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Docteur KOUAME Bi Prévost, Assistant à l'Université Pelefolo Gon Coulibaly de Korhogo, pour son apport à la caractérisation de nos huiles essentielles et de certains composés non volatils pendant sa formation doctorale à Nantes.

Je n'oublie pas Docteurs OUSSOU Kouamé Raphaël, OKOU Obou Constantin et ANNE Jean Claude pour leurs appuis scientifiques. Notamment la mise en place des protocoles des essais antibactériens.

Je remercie tout le personnel de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire en particulier les membres de l'Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Résistance aux Anti-infectieux (ASSURMI), avec qui j'ai passé tout mon troisième cycle.

Je remercie également tout le personnel du Laboratoire de Chimie Organique Biologique de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe.

A mes collègues Doctorants : Rubens, Antoine, Innocent, Sosthène, Baguy, Fernique, Rosine et Toty auxquels je souhaite bon courage pour la fin de leurs études.

Merci au Personnel de l'ENS, en particulier Melesse, Dramane et feu Albert, qui ont bien voulu nous accueillir lors de la fermeture du laboratoire de Chimie Organique Biologique de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan.

Merci à Monsieur GBAZIKE Gagouehi Alexis dit Pierre, indicateur botanique, à sa famille ainsi qu'à tous les habitants du village de BOBIA pour leur hospitalité et leur générosité. Vous m'avez été d'un apport inestimable au cours de la récolte des plantes.

Mon père et ma mère qui m'ont soutenus pendant toutes ces années, chacun à sa manière, et sans qui je n'aurai pas pu aller au bout de mes projets..., Merci à tous mes frères et sœurs : Siriki, Benogobou, Bassira, Ami, Bafessinin, Bakary et Saliou.

Merci aux Amis : Adama, Alima, Bruce, Hervé, Kigniman, Léontine, Maxime, Michel Za bi, Rodrigue, Rosette, Salia et Serge. Ils constituent le socle solide qui m'a permis d'arriver là.

Je remercie mon épouse Angélique pour sa précieuse aide, sa générosité et son agréable compagnie ainsi que son soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail. Je n'ai pas de mots pour te dire à quel point je te remercie, pour tout. Mais, tu le sais, le plus beau est à venir pour nous... Il nous reste 99 ans, non la vie entière pour en profiter.

Merci à nos loulous : Dylan, Lily et Gaël. Je n'oublie pas nos 3 anges...

Je ne saurais terminer cette série de remerciement sans penser à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail, recevez mes remerciements sincères.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ADP	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Collection Culture
ATPase	Adénosine Triphosphatase
BLSE	Bêtalactamase à Spectre Etendu
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CO ₂	Dioxyde de carbone
Da	Dalton
DO	Densité optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH :	1,1- Diphenyl-2-picryl-hydrazyle
ERO	Espèces réactives oxygénées
GM	Gentamicine
IPCI	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
KI	Indices de Kovats
m/z	Mass /charge number of ions
MM	Masse molaire
MS	Spectrométrie de masse
ORMICI	Observatoire de la résistance aux microorganismes en Côte d'Ivoire
QR	Résistance aux quinolones
RCFQ :	Résistance croisée aux fluoroquinolones
Rdt	Rendement
RI	Indices de rétention
Rpm	Rotations par minute
SOD	Super oxyde dismutase

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure chimique de quelques composés antimicrobiens des plantes (Cowan, 1991)	6
Figure 2: Les classes des constituants des huiles essentielles	11
Figure 3: les terpénoïdes susceptibles de présenter des activités antibactériennes (Kalemba, 2003).....	12
Figure 4: Principe du test DPPH.....	20
Figure 5: Mécanisme réactionnel du test FRAP	21
Figure 6: <i>Chromoleana Odorata</i>	22
Figure 7: <i>Ageratum conyzoides</i> plante entière et boutons floraux.....	24
Figure 8: <i>Croton hirtus</i> plante entière et boutons floraux	28
Figure 9: <i>Cardiospermum grandiflorum</i> plantes entière et boutons floraux	30
Figure 10: Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique	32
Figure 11 : Mode d'action des antibiotiques.	33
Figure 12: Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger utilisé pour .. l'extraction des huiles essentielles.....	42
Figure 13: Dispositif utilisé pour le fractionnement des huiles essentielles.....	43
Figure 14: Concentrations testées dans les tests antioxydants.....	50
Figure 15: Echantillon d'huiles essentielles de <i>A. conyzoides</i> , <i>C. hirtus</i> et <i>C. grandiflorum</i>	54
Figure 16: Rendements en huile essentielles de <i>A. conyzoides</i> (fleurs et tiges), <i>C. hirtus</i> (feuilles et tiges) et <i>C. grandiflorum</i> (parties aériennes).....	55
Figure 17: Répartition des familles de molécules présentes dans les fleurs de <i>Ageratum conyzoides</i>	58
Figure 18: Structures chimiques des composés majoritaires des fleurs de <i>A. conyzoides</i>	58
Figure 19: Répartition des familles de molécules des tiges de <i>Ageratum conyzoides</i>	60
Figure 20: Répartition des familles de molécules présentes dans les feuilles de <i>C. hirtus</i>	62
Figure 21 : Composés majoritaires issus des feuilles de l'huile essentielle de <i>Croton hirtus</i>	62
Figure 22: Répartition des familles de molécules présentes dans des tiges de <i>Croton hirtus</i>	64
Figure 23: Structure chimiques de quelques composés majoritaires des tiges d'huile essentielle de <i>Croton hirtus</i>	64
Figure 24: Répartition des familles de molécules présentes dans les feuilles, tiges et fleurs de <i>Cardiospermum grandiflorum</i>	66
Figure 25: Structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Cardiospermum grandiflorum</i>	66
Figure 26: Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de <i>Chromoleana odorata</i>	67
Figure 27: Résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Croton hirtus</i> <i>Chromoleana odorata</i> et <i>Cardiospermum grandiflorum</i>	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Composition chimique des fleurs de <i>Ageratum conyzoides</i>	57
Tableau II: Composition chimique des tiges de <i>Ageratum conyzoides</i>	59
Tableau III: Composition chimique des feuilles de <i>Croton hirtus</i>	61
Tableau IV: Composition chimique des tiges de <i>Croton hirtus</i>	63
Tableau V : Composition chimique des parties aériennes (feuilles + fleurs + tiges) de <i>Cardiopsernum grandiflorum</i>	65
Tableau VI : AntibioGramme des souches étudiées (diamètres d'inhibitions en mm).	68
Tableau VII : Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles	70
Tableau VIII: Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Croton hirtus</i> et <i>Chromoleana odorata</i>	72
Tableau IX: Concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles de <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Croton hirtus</i> et <i>Chromoleana odorata</i>	74
Tableau X : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de <i>Chromoleana odorata</i> et de ses fractions	75
Tableau XI : CMB des huiles essentielles de <i>Chromoleana odorata</i> et de ses fractions	76
Tableau XII : Diamètres d'inhibition de l'association de l'huile essentielle de <i>Croton hirtus</i> avec la gentamicine et la ceftazidime	77
Tableau XIII : Concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) pour les combinaisons d'huile essentielle de <i>C. odorata</i> et les antibiotiques	78
Tableau XIV : Résultats de l'activité antioxydante l'huile essentielle de <i>A. conyzoides</i> , <i>C. hirtus</i> , <i>C. grandiflorum</i> et <i>C. odorata</i>	79

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	I
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
TABLE DES MATIERES	VII
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. Les plantes en médecine	5
2. Les huiles essentielles	7
2.1 Définition	7
2.2 Activités biologiques des huiles essentielles	7
2.3 Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	8
2.4 Les facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles.....	14
2.4.1 Les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	14
2.4.2 Activité liée à la composition chimique.....	15
2.4.3 Le type des microorganismes cibles	15
2.4.4 Mode d'action des huiles essentielles	16
2.5 Activité antioxydante des huiles essentielles	17
2.5.1 Les différents types de radicaux libres.....	17
2.5.2 Origine et production des espèces réactives oxygénées.....	17
2.5.3 Dommages oxydatifs des radicaux libres.....	18
2.5.4 Moyens de défense contre les radicaux libres.....	19
2.5.5 Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> des propriétés antioxydants	20
3. Monographie des plantes étudiées	21
3.1 <i>Chromoleana odorata</i> (Asteraceae).....	21
3.1.1 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle.....	22

3.1.2 Constitution chimique	23
3.1.3 Propriétés biologiques des huiles essentielles de <i>Chromoleana Odorata</i>	23
3.2 <i>Ageratum conyzoides</i> (Asteraceae)	24
3.2.1 Etude botanique.....	24
3.2.2 Systématique et caractère morphologique	25
3.2.3 Distribution/ Habitat	25
3.2.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle.....	25
3.2.5 Constitution chimiques et données pharmacologiques	26
3.3 <i>Croton hirtus</i> (Euphorbiaceae)	27
3.3.1 Etude botanique.....	27
3.3.2 Systématique et caractère morphologique	27
3.3.3 Distribution/ Habitat	28
3.3.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle.....	28
3.3.5 Constitution chimiques et données pharmacologiques	28
3.3.5.1 Constituants volatils	28
3.3.5.2 Données pharmacologiques	29
3.4 <i>Cardiospermum grandiflorum</i> (Sapindaceae).....	29
3.4.1 Etude botanique.....	29
3.4.2 Systématique et caractère morphologique	29
3.4.3 Distribution/ Habitat	30
3.4.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle.....	30
3.4.5 Constitutions chimiques et données pharmacologiques.....	31
4. Antibiotiques et résistance microbienne	31
4.1 Antibiotiques.....	31
4.1.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques	32
4.2 Résistance aux antibiotiques	34
4.2.1 Les différents types de résistances	34
4.2.1.1 La résistance naturelle.....	34

4.2.1.2 La résistance acquise.....	34
4.2.2 Mécanismes biochimiques de résistance.....	35
4.3.2.1. Modification de l'antibiotique	35
4.3.2.2. Modification de la cible	35
4.3.2.3. Accessibilité réduite de la cible	36
4.3.2.4. Les systèmes d'efflux bactériens	36
5. Place des plantes dans la lutte contre la résistance	37
MATERIEL ET METHODES.....	38
1. Matériel.....	39
1.1 Matériel végétal et huiles essentielles.....	39
1.2 Souches bactériennes	39
1.3 Milieux de culture	40
1.4 Antibiotiques.....	40
1.5 Solvants et réactifs	41
1.6 Appareils	41
2. Méthodes.....	41
2.1. Extraction des huiles essentielles.....	41
2.1.1 Hydrodistillation	42
2.1.2 Méthode de l'hydrodistillation utilisée	42
2.1.3 Rendement en huile essentielle	43
2.2. Méthodes chromatographiques préparatives.....	43
2.2.1. Fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice.....	43
2.2.2. Chromatographie préparative sur couche mince.....	44
2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	44
2.3. Activités biologiques	45
2.3.1. Activités antibactériennes des huiles essentielles	45
2.3.1.1 Préparation de <i>l'inoculum</i> bactérien	45
2.3.2. Méthodologie des tests antibactériens.....	45

2.3.2.1 AntibioGramme en milieu solide.....	45
2.3.2.1.1. Ensemencement	46
2.3.2.1.2. Dépôt des disques.....	46
2.3.2.1.3. Lecture des disques	46
2.3.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles	46
2.3.3.1. Méthode de diffusion de disques	46
2.3.3.2. Technique de microdilution en milieu liquide	47
2.3.3.2.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	47
2.3.3.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide	48
2.3.3.3. Test de synergie entre l'huile essentielle de <i>Croton hirtus</i> et deux antibiotiques.....	48
2.3.3.3.1. Méthode de diffusion de disques	49
2.3.3.3.2. Méthode de microdilution en milieu liquide.....	49
2.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles.....	50
2.4.2.1. Piégeage du radical DPPH	51
2.4.2.2. Mesure du pouvoir réducteur	51
RESULATS ET DISCUSSION	53
1. Résultats	54
1.2 Etude chimique	54
1.2.1 Rendement en huile essentielle	54
1.2.2. Etude de la composition chimique des huiles essentielles.....	56
1.2.2.1 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ageratum conyzoides</i>	56
1.2.2.1.1 Les fleurs.....	56
1.2.2.1.2 Les tiges	59
1.2.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle des <i>Croton hirtus</i>	60
1.2.2.2.1 Les feuilles	60
1.2.2.2.2 Les tiges	63
1.2.2.3 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cardiospermum grandiflorum</i>	65
1.2.3. Fractionnement des huiles essentielles de <i>Chromoleana odorata</i>	67

1.3 Tests biologiques	68
1.3.1 Activité antibactérienne	68
1.3.1.1 Activité antibactérienne par la méthode de diffusion	68
1.3.1.1.1 Sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	68
1.3.1.1.2 Sensibilité aux huiles essentielles : test d'inhibition.....	69
1.3.2 Activité antibactérienne des fractions d'huile essentielle de <i>Chromoleana odorata</i>	75
1.3.3 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Croton hirtus</i> combinée avec des antibiotiques classiques (ceftazidime et gentamicine)	76
1.3.3.1 Diamètre d'inhibition.....	76
1.3.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	77
1.3.1 Activité antioxydante	78
2. Discussion	81
2.1 Etude chimique	81
2.1.1 Rendements.....	81
2.2.2 Composition chimique	82
2.2.3 Fractionnement des huiles essentielles de <i>Chromoleana odorata</i>	84
2.2 Activité antibactérienne des huiles essentielles	85
2.3 Activité antibactérienne des fractions de l'huile essentielle de <i>Chromoleana odorata</i>	86
2.4 Test de combinaison	87
2.5 Activité antioxydante.....	88
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
ANNEXES	viii

INTRODUCTION

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**O.M.S, 2002**). Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (**Muthu et al., 2006**). Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels de la plante est plus que jamais d'actualité.

En Côte d'Ivoire, les travaux réalisés sur les plantes médicinales sont abondants (**Zinzendorf, 1989 ; Kamanzi Atindehou, 2002 ; Vangah-Manda et al., 1994 ; Bouboutou et al., 1995 ; Weiss, 1997 ; Diehl, 1998 ; Djaman et al., 1998 ; Koné, 1998 ; Mobié et al., 1998 ; Traoré et al., 1999**). Ces travaux ont porté sur les propriétés biologiques, pharmacologiques et phytochimiques des plantes issues de médecine traditionnelle Ivoirienne. Ces données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en médecine traditionnelle. Si les compositions chimiques des huiles essentielles de nombreuses plantes issues de la pharmacopée Ivoirienne ont jusque-là été réalisées. Cependant, très peu de données existent sur leurs propriétés biologiques. Or, les huiles essentielles sont connues pour leurs nombreuses propriétés biologiques. Plus particulièrement leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes.

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation (**Akoua et al., 2004, Guessennd et al., 2004**). Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces bactériennes et ne cesse d'augmenter. La fréquence de souches de *Staphylococcus aureus* Métiline résistant isolées des cavités nasales des personnels hospitaliers des CHU d'Abidjan est passée de 23% en 2000 à 38,7% en 2004 (**Akoua et al., 2004**) tandis que la fréquence des entérobactéries productrices de BLSE et résistantes aux fluoroquinolones (avec une prévalence élevée de 27,2 % de gènes *qnr*) est largement supérieure aux taux observés dans de nombreux pays (**Guessennd et al., 2008**). Selon les derniers rapports de l'Observatoire de la Résistance aux Microorganismes en Côte d'Ivoire (O.R.M.C.I) cette situation est loin d'être maîtrisée.

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreux mécanismes pathologiques, notamment ceux dus au vieillissement, tels que l'athérosclérose, le cancer, les maladies auto-immunes ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (**Salvi, 1998; Salvi et al., 2002**). L'utilisation des antioxydants de synthèse dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques qui devait apporter une solution à cette situation a été largement décrite ces dernières années. En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques sont suspectés à long terme d'effets tétragènes, mutagènes

et cancérigènes (**Chavéron, 1999**). Les plantes constituent des antioxydants naturels. Ces dernières sont apparues comme une alternative aux antioxydants de synthèse.

Comme on peut le constater, la recherche de substances naturelles à activité antibactérienne et antioxydante issue de plantes constitue un enjeu scientifique important. C'est dans ce cadre qu'une investigation des composés volatils de quatre plantes médicinales: *Chromolaena odorata*, *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) et *Cardiospermum grandiflorum* (Sapindaceae), issues de la médecine traditionnelle Ivoirienne a été entreprise. L'intérêt de ces plantes pour la médecine et la recherche de nouvelles molécules, réside dans le fait qu'elles sont largement utilisées par les populations pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses.

L'objectif général de ce travail est d'étudier la composition chimique et les propriétés antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles de quatre plantes issues de la médecine traditionnelle Ivoirienne.

Pour atteindre cet objectif, les objectifs spécifiques suivant ont été dégagés:

- Etudier la composition chimique des huiles essentielles par différentes méthodes chromatographiques ;
- Fractionner les huiles essentielles par chromatographie sur colonne ;
- Evaluer l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles et de leurs fractions sur les souches bactériennes ;
- Evaluer les propriétés antioxydantes de ces huiles essentielles.

En vue de rendre compte de la démarche scientifique adoptée, ce manuscrit comportera trois parties.

Dans une première partie, une revue bibliographique sera présentée sur les plantes en santé humaine, les huiles essentielles, la description des espèces végétales utilisées dans ce travail. La problématique de la résistance aux antibiotiques sera également présentée dans cette partie.

La deuxième partie du manuscrit présentera le matériel et les méthodes utilisés, notamment l'extraction des huiles essentielles ainsi que l'analyse de leur composition chimique ; le fractionnement chromatographique et l'étude de leur activité antibactérienne. L'évaluation de l'activité antioxydante terminera cette deuxième partie.

Les résultats obtenus, suivis de la discussion puis la conclusion et les perspectives feront l'objet de la troisième et quatrième partie, respectivement. Les références bibliographiques constitueront la dernière partie du manuscrit.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes en médecine

Les plantes ont de tout temps été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes métabolites notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes et polypeptides. Quelques-uns de ces composés sont décrits à la figure 1 (**Cowan, 1999**).

Depuis la préhistoire, plus d'une centaine ou milliers de plantes ont été utilisées dans le monde entier sous forme de cataplasme ou d'infusion. En Côte d'Ivoire, de nombreux travaux ont été réalisés sur les plantes médicinales on peut citer ceux de **Zinzendorf (1989)**, **Kamanzi Atindehou (2002)**, **Vangah-Manda *et al.* (1994)**, **Bouboutou *et al.*, (1995)**, **Weiss (1997)**, **Diehl (1998)**, **Djaman *et al.* (1998)**, **Koné (1998)**, **Mobié *et al.* (1998)**, **Traoré *et al.* (1999)**. Ces données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en médecine traditionnelle.

La majorité de la population mondiale (75%) représentant la tranche vivant sous le seuil de la pauvreté, utilise les plantes pour subvenir aux besoins de santé primaire, malgré l'existence des médicaments synthétiques (**Duke., 1990**). Comme dans beaucoup d'autres pays d'Afrique subtropicale, plus de 75 % des ivoiriens se soignent par les plantes (**Pousset., 1994**).

Cette ruée vers la médecine par les plantes peut s'expliquer par le fait que les plantes sont accessibles et abondantes, rendant ainsi la médecine par le traitement des plantes, abordable surtout dans les pays en voie de développement (**OMS, 2002**). De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absents, au contraire des médicaments semi-synthétiques ou synthétiques (**Iwu, 1999 ; Cowan, 1999**).



6

2. Les huiles essentielles

2.1 Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique (**Kalemba, 2003**). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (**Burt, 2004**), mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation, expression à froid, comme les agrumes (**Burt, 2004**). De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (**Santoyo et al., 2005**) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (**Kimbaris et al., 2006**).

2.2 Activités biologiques des huiles essentielles

Le rôle physiologique des huiles pour le rôle végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et propriétés biologiques.

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (**Siani et al., 1999**). Plus récemment, des études ont montré que les huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, donnaient des tests d'inhibition positifs sur la lipoxigénase L-1 de soja, modèle de la lipoxigénase humaine (5-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation (**Bedi et al., 2004**). Ensuite, dans une autre étude, il a été montré que celles de *Chromolaena odorata* présentaient des actions positives sur la fonction Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase (**Bedi et al., 2010**). Enfin, les mêmes auteurs ont montré que les huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus*, *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus citriodora* avaient des activités inhibitrices sur la cyclooxygénase (**Bedi et al., 2003**).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de *Melaleuca alternifolia* (**Burt, 2004**) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (**Barel et al., 1991**), *A. terrefolia* (**Unlu et al., 2002**) et *A. millefolium* (**Candan et al., 2003**), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération des métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la

tumeur P815 (**Mbarek et al., 2007**). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (**De Sousa et al., 2004**).

D'autres applications médicales ont fait l'objet d'études. Les travaux réalisés par **Oussou (2009)**, ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de *Ocimum canum* à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Ceux de **Monti et al., (2002)** ont montré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol. Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (**Umezu, 1999**) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction de certaines drogues, comme la nicotine (**Zaho et al., 2005**).

2.3 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie (**Heath, 1981**). Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes.

Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1995**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**).

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques.

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba, 2003 ; Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012**). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (**Oussou et al., 2009**). Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al., 2006 ; Oussou, 2009**).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram à Gram négatif comme *Aeromonas hydrophila* (**Wan et al., 1998**) et *Campylobacter jejuni* (**Wannissorn et al., 2005**) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles.

La bactérie reconnue comme la moins sensible à leur effet reste néanmoins les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (**Dorman, 2000**). En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *Pseudomonas aeruginosa* deviennent actives (**Mann et al., 2000**). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (**Hammer et al., 1999 ; Deans et Ritchie, 1987**).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. **Oussou** en 2009 a étudié les propriétés antibactériennes de quelques huiles essentielles issues de la pharmacopée traditionnelle Ivoirienne, *Ocimum gratissimum*, *O. cimumcanum*, *Xylopia aethiopica*, *Citrus aurantifolia*, *Lippia multiflora*, et *Monanthes toxeia*. Les huiles essentielles de ces plantes se sont révélées efficaces contre les bactéries multi résistantes notamment les *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3GR), *E. coli* productrice de betalactamases à spectre élargi (BLSE) et staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM).

2.3.1 Composition chimique des huiles essentielles

2.3.1.1 Composition chimique et variabilité

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (**Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Boti et al., 2006, Oussou et al., 2009**). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (**Salzer, 1977**). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (**Tomi et al., 1995**).

Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. Le cas de *Chromolaena odorata* qui présente divers chémotypes, on peut citer ceux de la Côte d'Ivoire (α -pinène, géjérène et préjérène) (**Bedi et al., 2001**), du Bénin (α -pinène, préjérène, géjérène, β -pinène et germacrène-D) (**Avlessi et al., 2012**) de la Chine (β -caryophyllène, δ -cadinène, α -copaène et oxyde de β -caryophyllène) et du Cameroun (α -Pinène et

p-cymène). On peut aussi citer *Ageratum conyzoides* qui présente trois chemotypes : un chemotype à précocène I, un chemotype à précocène I et précocène II, un chemotype à précocène II et à 6-méthoxyagératochromène (Nébié *et al.*, 2004).

Kouamé en 2012 a démontré que le rendement en huile essentielle de *Chromoleana odorata* diffère avec la période et la zone de récolte. Il a également observé un seul et même chemotype sur l'ensemble des 5 sites. Ce chemotype est dominé par les sesquiterpènes germacrène-D (15,3-20,0%), géijérène (14,1-16,9%), prégéijérène (10,7-12,3%) et β -caryophyllène (7,5-9,7%) et le monoterpène α -pinène (7,6-10,3%) et identique à celui décrit dans la littérature (**Bedi**, 2001).

2.3.1.2 Les constituants des huiles essentielles

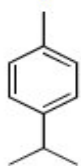
Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (**Buchanan *et al.*, 2000**). La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles. Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Figure 2).

1. Terpenes

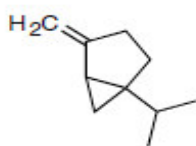
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("y") or p.cymene

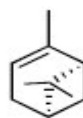


Sabinene

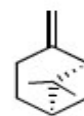


Carbure bicyclic

Alpha-pinene

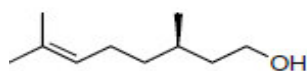


Betapinene

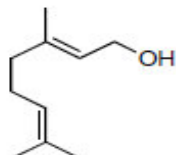


Alcohol acyclic

Citronellol

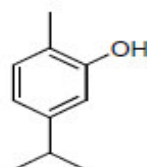


Geraniol

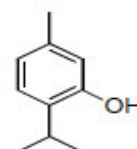


Phenol

Carvacrol



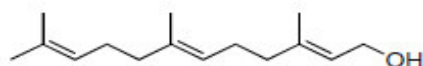
Thymol



-Sesquiterpenes

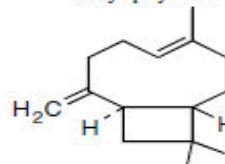
Carbure

Farnesol



Alcohol

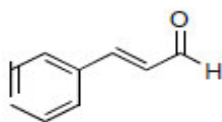
Caryophyllene



2. Aromatic compounds

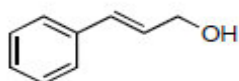
Aldehyde

Cinnamaldehyde



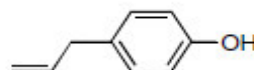
Alcohol

Cinnamyl alcohol



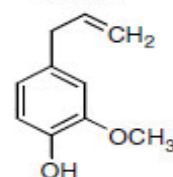
Phenol

Chavicol



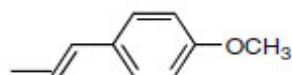
Phenol

Eugenol



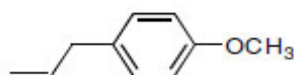
Methoxy derivative

Anethole



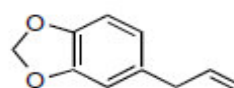
Methoxy derivative

Estragole



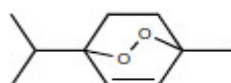
Methylene dioxy compound

Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

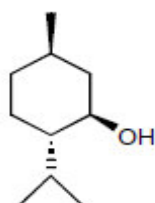


Figure 2: Les classes des constituants des huiles essentielles

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées. Une liste, visant à classer les constituants des huiles essentielles en fonction de l'intensité de leur activité, a d'ailleurs été établie (**Kalembe, 2003**). Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol (Figure 3a, 3b et 3c), sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, de *Corydthymus capitatus* et de *Syzygium aromaticum*, démontrent les plus hautes activités antibactériennes.

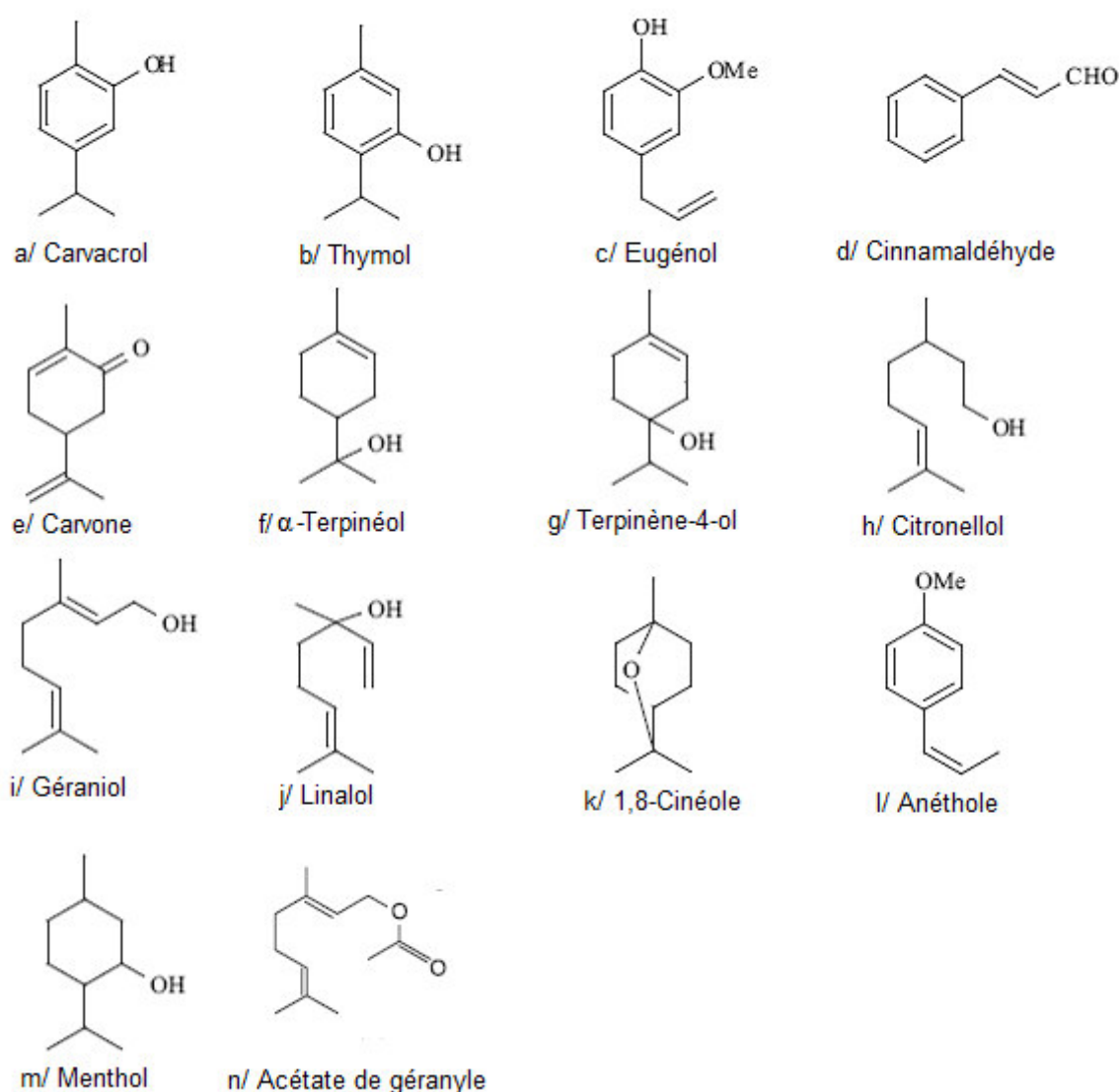


Figure 3: les terpénoïdes susceptibles de présenter des activités antibactériennes (**Kalembe, 2003**)

Les composés carbonylés, appartenant aux familles chimiques des aldéhydes et des cétones sont également décrits comme très actifs. Le cinnamaldéhyde (Figure 3d), principal constituant de l'huile essentielle, et la caravone (Figure 3e), qui entre dans la composition de l'huile de menthe poivrée, font partie de ce groupe.

De nombreuses huiles essentielles présentent une forte teneur en alcools. L'huile de *Melaleuca alternifolia* riche en α -terpinéol et en terpinène-4-ol (Figure 3f et 3g), celle de *Pelargonium asperum*, est constituée essentiellement de citronellol et de géraniol (Figure 3h et 3i). Ou encore celle de *Lavandula angustifolia* dominée par le linalol (Figure 3j). Les alcools sont légèrement moins actifs que les composés phénoliques et carbonylés. Leur activité antibactérienne est toute fois plus élevée que celle générée par les éthers, comme le 1,8 cinéole ou l'anéthole (Figure 3k et 3l), et les molécules hydrocarbonées.

La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. Une étude menée par **Ultee et al.** en 2002, a mis en évidence l'importance du noyau benzénique, en démontrant le manque d'activité du menthol (Figure 2m) comparée à celle du carvacrol. Le rôle fondamental du groupement hydroxyle dans l'action des phénols a également été confirmé (**Dorman, 2000 ; Ultee et al., 2002**) et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité. Ainsi, le thymol et le carvacrol, qui ne diffèrent que par la position ortho/méta du substituant hydroxyle, présentent une activité comparable sur des souches de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Lambert et al., 2001 ; Ultee et al., 2002**). D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle (Figure 2n) est plus actif que le géraniol, contre grand nombre de bactéries Gram à positif et à Gram négatif (**Dorman, 2000**). La nature des groupements alkyles. Ainsi, le limonène, qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus haute activité que son homologue le *p*-cymène, substitué par un groupement isopropyle (**Dorman, 2000**).

Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent également affecter leur activité. Par exemple, l'efficacité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est due à la synergie entre les principaux constituants : le carvacrol et le thymol (**Lambert et al., 2001**). Une autre interaction synergique a été mise en évidence entre le carvacrol et son précurseur, le *p*-cymène sur *Bacillus cereus*. Le *p*-cymène semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action (**Ultee et al., 2002**). Des effets antagonistes, conduisant à une réduction de l'activité antibactérienne, ont également été signalés. Ils se produisent généralement entre molécules actives

et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité. Par exemple, la solubilité du terpinène-4-ol est réduite par le γ -terpinène (Cox *et al.*, 2001).

2.4 Facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles

Plusieurs facteurs influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation antimicrobienne, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblés et leur éventuelle adaptation aux huiles essentielles.

2.4.1 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Les techniques utilisées ont une grande influence sur les résultats. Ces méthodes utilisées donnent parfois des résultats différents selon les conditions opératoires expérimentales pour chaque manipulateur (Surk, 2003). L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une des explications de la variété des techniques d'évaluation. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre.

2.4.1.1 Méthode de diffusion en milieu solide

Cette méthode est aussi appelée méthode de l'aromatogramme, ou technique de l'antibioaromatogramme ou encore méthode de Vincent (Pibri, 2006). La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient très diluée, il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est petite, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance des microorganismes est faible.

2.4.1.2 Méthode de dilution en milieu liquide

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/mL ou mg/L).

2.4.1.2.1 Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution).

2.4.1.2.2 Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélifié à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un *inoculum* bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

2.4.2 Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité d'une huile essentielle est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

Il est connu que ce sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées.

2.4.3 Le type des microorganismes cibles

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des huiles essentielles. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram

négatif), *Candida albicans* (Levures) et *Aspergillus niger* (champignons) ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram négatif apparaissent plus résistants que les Gram positif vis-à-vis des huiles essentielles (Cox *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 1998). Inversement, *Escherichia coli* est plus sensible vis à vis de l'huile de *Melaleuca alternifolia* que *Staphylococcus aureus* (Hayes *et al.*, 1997). De même, certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile de genévrier que les bactéries (Chao *et al.*, 2000). Enfin, une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quel que soit les huiles essentielles par rapport à celles vivant en aérobiose (Amaral *et al.*, 1998; Juven *et al.*, 1994).

2.4.4 Mode d'action des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+): ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram à négatif (*Escherichia coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1995). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Zani *et al.*, 1991). Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes: en général, les bactéries Gram à négatif sont plus résistantes que les Gram à positif grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram à négatif est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de

Gram négatif qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaires comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupements fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (**Dorman, 2000**).

2.5 Activité antioxydante des huiles essentielles

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (**Walker et al., 1982**).

2.5.1 Différents types de radicaux libres

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou, un pouvoir oxydant fort. Il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe (**André., 1998**).

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO \cdot$), le radical peroxyde ($ROO \cdot$) et le radical alkoxy ($RO \cdot$). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

2.5.2 Origine et production des espèces réactives oxygénées

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduit et produisent des anions superoxyde, de l'eau oxygénée et éventuellement des radicaux hydroxyles (**Pincemail et al., 2002 ; Favier, 2003 ; De Moffarts et al., 2005**). L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogène ou endogène s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Ce dernier donne le (H_2O_2)

par dismutation. Le $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 participent à la libération d'hypochlorite sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002 ; De Moffarts et al., 2005**).

A côté de ces sources majeures des ROS, d'autres sources existent. Les sources cytosoliques, constituées essentiellement de peroxydase qui constitue une source importante de la production cellulaire de H_2O_2 (**Sevanian et al., 1990; Valko et al., 2007**), la xanthine oxydase qui produit de l' $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 (**Groussard, 2006**) et les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques) (**Massion et al., 2002**).

A cela, s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres. On peut citer entre autres, les rayonnements UV capables de générer des anions superoxyde ou de l'oxygène singulet, les rayons X ou γ sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (**Tamer, 2003**) les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS (**Favier, 2003 ; Wang et al., 2008**). Les fumées de combustion (cigarettes), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (**Pincemail et al., 2001 ; Lee et al., 2006 ; Pincemail & Defraigne, 2004**). Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon **Aurousseau (2002)**, des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

2.5.3 Dommages oxydatifs des radicaux libres

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2003**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Aurousseau, 2002 ; Valko et al., 2006**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (**Aruoma, 1998**). Parmi lesquelles les maladies d'Alzheimer de Parkinson, de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites, les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2003**)

2.5.4 Moyens de défense contre les radicaux libres

D'après **Halliwell (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (**Virost, 2004**).

▪ Prévention à plein temps

Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

▪ Détoxification active suite à une attaque oxydante

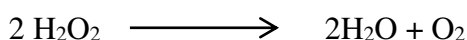
Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (**Valko et al., 2006**).

- Super oxyde dismutase (SOD)

Dans l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**).

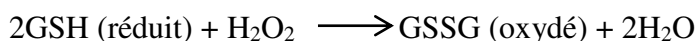
- Catalase

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al., 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



- Glutathion peroxydase

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Valko et al., 2006**).



▪ Détoxification passive

Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle inclut tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque (Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko *et al.*, 2006).

La vitamine E est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Pryor, 2000 ; Valko *et al.*, 2006). Durant la réaction antioxydante, l' α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy) : vitamine C, caroténoïdes, acide lipoïque, albumine et composés phénoliques.

2.5.5 Méthodes d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydants

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude: la méthode au DPPH (Diphényl Picrylhydrazyle) et la méthode de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

▪ La méthode de DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque (Cotelle *et al.*, 1996 ; Trouillas *et al.*, 2003), le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (Figure 4). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

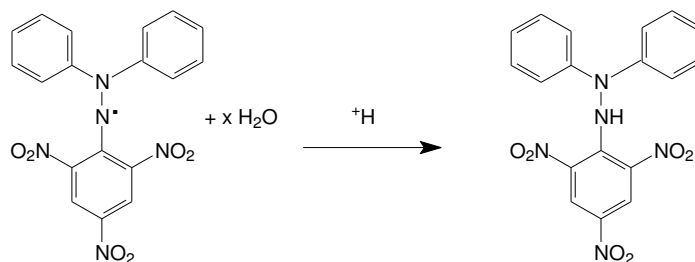


Figure 4: Principe du test DPPH

- La méthode de FRAP

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode Hinneburg adaptée par **Lamien-Meda *et al.*** en 2008. Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (Figure 5). La variation de la coloration est mesurée 700 nm.

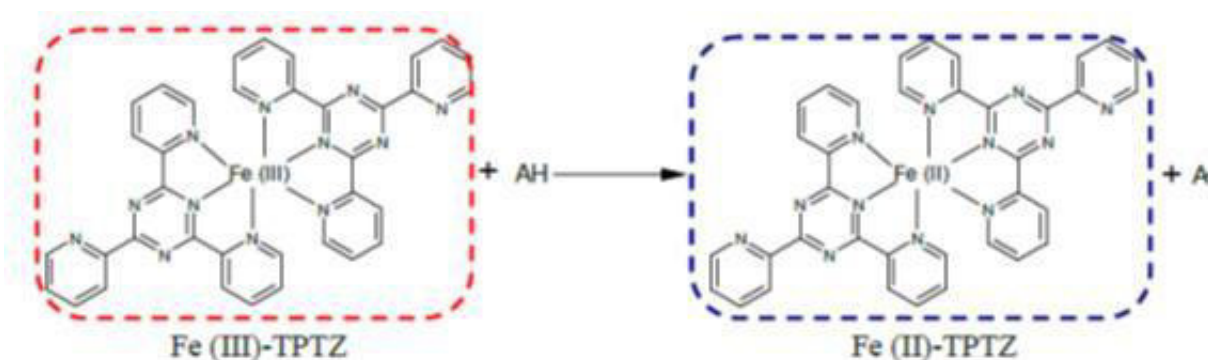


Figure 5: Mécanisme réactionnel du test FRAP

3. Monographie des plantes étudiées

3.1 *Chromoleana odorata* (Asteraceae)

Chromoleana odorata communément appelé en Côte d'Ivoire « Sékou Touré » est une herbe ou un arbuste appartenant à la famille des Asteraceae (Figure 6). Elle a été acclimatée en Côte d'Ivoire vers 1950 pour fertiliser le sol dans la culture des palmiers à huiles. Cette plante a fait l'objet de plusieurs études dans le monde. Dans notre laboratoire, la variation des rendements en huiles essentielles et l'étude de la composition chimique selon le lieu de récolte et la saison ont été effectués (**Kouamé, 2012**). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des tests bactériologiques des huiles essentielles extraites. Cependant, il faut signaler que des résultats concernant cette plante, sont décrits dans la littérature comme l'indiquent les écrits qui suivent.



(Source Kouamé P. 2012)

Figure 6: *Chromolaena Odorata*

3.1.1 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

Les extraits de différents organes de *C. odorata* ont été utilisés en médecine traditionnelle pour lutter contre divers maux. La décoction de feuilles est utilisée pour traiter l'asthme et pour baisser la fièvre chez les enfants atteints de varicelle (**Bouda *et al.*, 2001**). Elle est également utilisée comme remède contre la toux, les infections de la peau (impétigo, et la teigne) et dans le maintien de l'homéostasie (**Agu, 1980; Irobi, 1997**). Au Vietnam et dans de nombreux pays tropicaux, les feuilles fraîches ou la décoction sont utilisées dans le traitement de la morsure de sangsue, de la blessure de brûlures, de l'infection de la peau et de la dento-alvéolaire (**Le, 1995 ; Phan 2001**).

Les extraits aqueux de la plante sont utilisés dans le traitement du paludisme (**Thakong, 1999; Akah, 1990, Ayensu, 1978**), comme cataplasme pour arrêter une hémorragie externe (**Triratana, 1991**) et favoriser la cicatrisation de la plaie. En Côte d'Ivoire, la plante est utilisée pour soigner les douleurs abdominales et les céphalées, et comme cicatrisant et agent antiseptique local (**Zakaria, 1994**). La décoction de feuilles est utilisée comme boisson pour le traitement du paludisme et du diabète (**Bedi, 2004**). Le pétrissage de feuilles est employé, après solubilisation de la pâte obtenue

dans l'eau, comme purge pour le traitement de la diarrhée. Elle est également utilisée comme agent hémostatique dans le saignement du nez (**Bamba, 1993**).

En Thaïlande, la décoction des tiges de la plante peut être utilisée en cas d'hémorragie pulmonaire. Elle est également utilisée comme agent hémostatique pour arrêter des saignements de coupures fraîches et du nez (**Thakong, 1999**).

3.1.2 Constitution chimique

Les rendements en huiles essentielles de *C. odorata* n'excèdent pas 0,2 % dans le meilleur des cas sur tous les sites de récolte (**Kouamé, 2012**). D'autre part, aucune variation appréciable n'a été observée lorsqu'on tient compte des paramètres tels que le site géographique et la saison (**Kouamé, 2012**). Par contre, il a été constaté dans cette étude, une baisse des rendements selon la durée de séchage des feuilles de la plante (**Kouamé, 2012**).

En ce qui concerne la composition chimique, les études effectuées par **kouamé (2012)**, montrent que sur cinq communes de la ville d'Abidjan, les huiles essentielles ont présenté le même chemotype à germacrène-D (20%), géigérène (17%), prégeigérène (12%), α -pinène (10%), β -caryophyllène (9%), β -pinène (5%) et δ -cadinène (5%) (**kouamé, 2012**). Ce chemotype est le même que celui obtenu à la Riviera (Cocody) par **Bedi et al.** en 2001, au Cameroun par **Pamo et al.**, en 2004 et au Congo par **Phan et al.** en 1996. Cependant, il est différent des chémotypes du Nigeria (**Inya-agma et al., 1987**) et du Vietnam (**Nguyen et al., 1992**), constitué respectivement de α -pinène (19,3%) et geigérène (42,5%).

3.1.3 Propriétés biologiques des huiles essentielles de *Chromoleana Odorata*

Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *C. odorata* ont été démontrées par plusieurs travaux (**Avlessi et al. 2012 ; Inya-Agha, 1987 ; Bamba, 1993 ; Moses, 2010**). **Avlessi et al.** en 2012 a mis en évidence les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de feuilles de *Chromoleana odorata* avec des CMI égale $1,28 \pm 0,06$ mg/mL et $5,11 \pm 0,25$ mg/mL respectivement sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de *Escherichia coli* ATCC 25922. Plusieurs auteurs ont également montré que l'huile essentielle de cette plante est active sur les souches de *S. aureus* (**Inya-Agha., 1987**), *E. coli* (**Inya-Agha., 1987 ; Bamba., 1993**), *P. aeruginosa* (**Bamba, 1993**) et *B. cereus* (**Moses, 2010**). Ses propriétés antifongiques sur *Aspergillus niger* (**Moses, 2010**), *A. ochraceus* et *P. digitatum* (**Avlessi, 2012**) ont également été démontré.

Les travaux de notre laboratoire ont montré que les huiles de *C. odorata* pouvaient inhiber la lipoxygénase L1 de soja, modèle de la lipoxygénase 5LO humaine, montrant ainsi des propriétés

antiinflammatoires (**Bedi et al., 2010**). La même équipe a par ailleurs montré que les huiles essentielles de *C. odorata* pouvaient activer la cyclooxygénase de la prostaglandine-H synthétase, protéine impliquée dans les processus de l'inflammation (**Bedi et al., 2010**).

3.2 *Ageratum conyzoides* (Asteraceae)

Cette plante tropicale est largement répandue en Afrique de l'ouest, en Asie et en Amérique de l'Ouest. Elle est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuses maladies (Figure 7).

3.2.1 Etude botanique

- Nom scientifique : *Ageratum conyzoides* L.
- Noms vernaculaires :
 - Wolof : Gobu
 - Bambara :nungu
 - Dida : plihoulipiti
 - Ibo : Nri-ewu



(Source Touré D. 2012)

Figure 7: *Ageratum conyzoides* plante entière et boutons floraux

3.2.2 Systématique et caractère morphologique

Ageratum conyzoides est une herbacée appartenant à la famille des Asteraceae (**Okunade, 2002**). C'est une plante herbacée annuelle d'environ 1 m de hauteur. Les feuilles et les tiges sont couvertes de fins poils et blancs. Les feuilles opposées sont douces au toucher, de forme ovale elles peuvent atteindre 7,5 cm de long. Les fleurs se rassemblent en petits capitules mauves ou bleu pâles. Le fruit est un akène avec pappus. La plante froissée dégage une odeur caractéristique (**Okunade, 2002 ; Brojendro, 2013**).

3.2.3 Distribution/ Habitat

Cette plante tropicale, est largement répandue en Afrique de l'ouest et quelques que fois en Asie et en Amérique de l'ouest.

Elle pousse dans les lieux humides comme les rizières en jachères après le retrait des eaux et également à proximité des habitations.

3.2.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

La plante est surtout connue pour ses vertus thérapeutiques. En Côte-d'Ivoire, chez les Abbey et Krobou, elle est employée, dans le traitement de la migraine, pour faciliter l'accouchement et comme antipaludique (**N'Guessand, 2008**). Selon **Ouattara** en 2006, les populations Dida de Divo, dans le Sud forestier de la Côte-d'Ivoire, l'utilisent contre l'épilepsie. Dans le Centre-Ouest de la Côte-d'Ivoire, on l'emploie contre les céphalées (**Tra-Bi, 1997**). Les feuilles sont utilisées comme anthelminthique (**Kamanzi, 2002**). Les ethnies Akan de la région littorale de la Côte-d'Ivoire l'emploient dans le traitement des maux d'yeux et la rougeole (**Vangah, 1986**). Cette plante est utilisée comme purgatif, fébrifuge, en ophtalmologie, dans les coliques, dans le traitement des ulcères et les pansements (**Githen, 1948**). Au Sénégal, la plante est utilisée comme antiallergique et antalgique. Dans certains pays d'Afrique, la plante est indiquée dans le traitement des maladies infectieuses et mentales aussi bien que les maux de tête et les dyspnées (**Kerharo., 1974**). Au Cameroun et au Congo, la plante est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des fièvres, du rhumatisme, des maux de tête, du diabète et des coliques (**Menut et al, 1993; Bioka et al.,1993; Soumyanath, 2006**). Les feuilles écrasées dans de l'eau sont données comme émétique, comme ovule vaginale pour les troubles utérins (**Abbiw, 1990**). La plante est utilisée au Nigeria dans le traitement des affections de la peau et dans la cicatrisation des plaies, la décoction de la plante est prise sous forme de boisson pour traiter les diarrhées et à soulager les douleurs de nombrils chez les enfants (**Okunade, 2002**). En Afrique centrale, la plante est tout particulièrement utilisée pour traiter les blessures causées par les brûlures (**Durodola, 1977**). Au Kenya, elle est utilisée en médecine traditionnelle, comme antiasthmatique, antispasmodique, et hémostatique

(**Kokwaro, 1976**). En Inde, elle est utilisée pour traiter les cas de lèpre et comme lotion d'huile pour les affections oculaires purulentes (**Katsuri, 1973**). Au Brésil, le thé médicinal à base de *A. conyzoides* est utilisé comme antiinflammatoire, analgésique et antidiarrhéique (**Yamamoto, 1991**). Au Vietnam, la plante est utilisée pour traiter particulièrement les maladies gynécologiques (**Sharma, 1995**). Dans d'autres médecines traditionnelles, elle est utilisée pour le traitement du rhumatisme, de la maladie du sommeil, désinfectant pour les maux de dents, comme antitussif, vermifuge et tonic (**Burkill, 1985**).

3.2.5 Constitution chimiques et données pharmacologiques

3.2.5.1 Constituants en métabolites secondaires volatils

Les rendements en huiles essentielles de cette plante ne dépassent pas 0,2% et les huiles sont composées de phénols, d'esters phénoliques, de coumarines, de β -caryophyllènes et d'agératochromènes (**Vera, 1993**) ou encore d'eugénol composé majoritaire des huiles essentielles isolées d'espèces africaines (**Ekundayo et al., 1988**).

L'étude des huiles essentielles des feuilles d'*Ageratum conyzoides* acclimaté dans diverses régions, montre que ses huiles essentielles contiennent principalement de l'agératochromène (précocène II) et/ou dérivés (**Nébié et al., 2004**). L'espèce acclimatée dans la zone occidentale africaine se caractérise par une forte teneur en précocène I. C'est le cas du Congo (87%), du Burkina Faso (86% de précocène I), du Ghana (80,29%), du Nigeria (82,2 %), du Bénin (85,6%), de la Côte-d'Ivoire (80%) et du Cameroun (81%) (**Nébié et al., 2004**). Celle rencontrée dans la zone asiatique telle qu'au Vietnam, au Pakistan ou encore en Inde possède des huiles essentielles qui contiennent en proportions appréciables du précocène I et II. Par contre celles des pays tel que le Vietnam ou les îles Fiji contiennent des huiles essentielles contenant en proportions appréciables le précocène II et le 6-méthoxyagératochromène.

Plusieurs chemotypes ont ainsi été mis en évidence : chemotypes à précocène I (7-méthoxyagératochromène), chemotypes à précocène I et II (agératochromène) chemotypes à précocène II et à 6- méthoxyagératochromène (dérivé) (**Nébié et al., 2004**).

3.2.5.2 Données pharmacologiques

Les huiles essentielles de *A. conyzoides* inhibent la croissance de *Aspergillus parasiticus* ainsi que la production de l'afltoxine (**Patil et al., 2010**). Par ailleurs, l'extrait aqueux de cette plante possède des propriétés hypotensives, antispasmodiques (**Achola et al., 1994**), antioxydant et insecticides (**Amal et al., 2010**). *A. conyzoides* possède également une activité larvicide sur *Anopheles stephensi*

(Neetu *et al.*, 2011). L'extrait hydro alcoolique possède des propriétés antalgique et anti-inflammatoire (Jose *et al.*, 1997).

L'extrait aqueux et éthanolique a montré une activité antibactérienne potentielle sur *Alcaligenes viscolactis*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus cereus* et *Streptococcus pyogenes* (Moody *et al.*, 2004), de même que sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) (Akinyemi *et al.*, 2005).

3.3 *Croton hirtus* (Euphorbiaceae)

Plusieurs espèces du genre *Croton* sont utilisées en médecine traditionnelle Africaine, Américaine et Sud-Américaine dans le traitement de nombreuses pathologies (Salatino *et al.*, 2007). Contrairement à d'autres espèces du genre *Croton* qui ont fait l'objet de nombreux travaux, *Croton hirtus* est l'une des espèces les moins étudiées.

3.3.1 Etude botanique

- Nom scientifique : *Croton hirtus* L'Hér., 1785
- Synonymes (Silva *et al.*, 2010): *Croton aberrans* Müll.Arg. et *Croton guaraniticus* Chodat & Hassl.
- Noms vernaculaires :
 - Dida : Gbabo

3.3.2 Systématique et caractère morphologique

Le genre *Croton* appartient à la famille des Euphorbiaceae. Il est constitué d'environ 12.000 espèces variant des arbustes aux grands arbres et aux lianes qui se développent dans les écosystèmes les plus variables (Secco, 1992). *Croton hirtus* est une herbacée, de croissance verticale jusqu'à 1 m de haut. La plante entière est recouverte de poils. Les feuilles sont à peu près en forme d'œuf dans les grandes lignes, de 2,5-7,5 cm de long et 1-5 cm de large et sont disposées en alternance. Les fleurs sont disposées en grappes spiciformes (grappes) de 4 cm de long à l'extrémité des rameaux (Henty & Pitchard, 1973; Waterhouse & Mitchell, 1998; Welzen & Chayamarit, 2007) (Figure 8).



(Source Toure D. 2012)

Figure 8: *Croton hirtus* plante entière et boutons floraux

3.3.3 Distribution/ Habitat

Croton hirtus L'Herit est originaire des Antilles, de l'Amérique centrale et du Sud. Elle est ensuite devenue une mauvaise herbe en Asie tropicale et en Afrique. En Inde, elle a été rapportée de Tirunelveli Hills de Ghâts occidentaux (Kottaimuthu *et al.*, 2012).

3.3.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces appartenant au genre *Croton* sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, de l'hyper cholestérolémie, de la diarrhée (Campos *et al.*, 2002), des troubles hépatiques ou encore comme amaigrissant (Grassi-Kassisse *et al.*, 2003), anti-inflammatoire et analgésique (Suárez *et al.*, 2003). D'autres espèces sont utilisées dans le traitement de diverses maladies digestive, hypotensive, et sont utilisés pour traiter les bronchites, les diarrhées et les dysenteries. De nombreuses autres espèces sont également utilisées comme fébrifuge et antipaludique (Vigor, 2001).

3.3.5 Constitution chimiques et données pharmacologiques

3.3.5.1 Constituants volatils

Les rendements en huiles essentielles sont faibles et ne dépassent pas 0,2%. L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de cette plante a permis de mettre en évidence la présence des composés : spathulenol (26,7%), E-caryophyllène (10,0%), bicyclo germacrène (9,5%), α -cadinol (7,7%) et cubenol (7,0%). Un autre chemotype signalé au Brésil a montré E-

caryophyllène (27,9-37,3%), germacrène-D (6,3-33,7%), α -cadinène (7,0-16,1%), δ -cadinène (1,8-13,5%) et α -humulène (3,6-4,6%) comme les composés majoritaires (**De Lima et al., 2012**).

3.3.5.2 Données pharmacologiques

Si l'étude phytochimique de *Croton hirtus* reste très peu connue, plusieurs études ont été réalisées sur de nombreuses espèces du genre *croton*. Du point de vue phytochimique, le genre *Croton* contient des alcaloïdes, des flavonoïdes et des diterpènes. Cependant il faut signaler que peu de données pharmacologiques sont disponibles pour *Croton hirtus*.

Si *C. hirtus* est peu connu pour ses propriétés antibactériennes, il n'en pas de même pour certaines espèces du genre dont les propriétés antibactériennes ont été étudiées. Ainsi **Babili et al.** en 2009 ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *C. campestris* inhibait la croissance de *S. aureus*. Quant à **Matias et al.** en 2010, ils ont mis en évidence les propriétés antibactériennes de l'extrait hexanique des feuilles de *C. campestris* sur *S. aureus*. **Thiago et al.**, en 2013 ont montré que l'huile essentielle de *C. campestris* en association avec les aminosides et les quinolones inhibait la croissance de *S. aureus* et *P.aeruginosa*. Par ailleurs **Rodrigues et al.**, en 2009, ont montré que l'huile essentielle de *C. zehntneri* exerce une activité inhibitrice sur la croissance *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

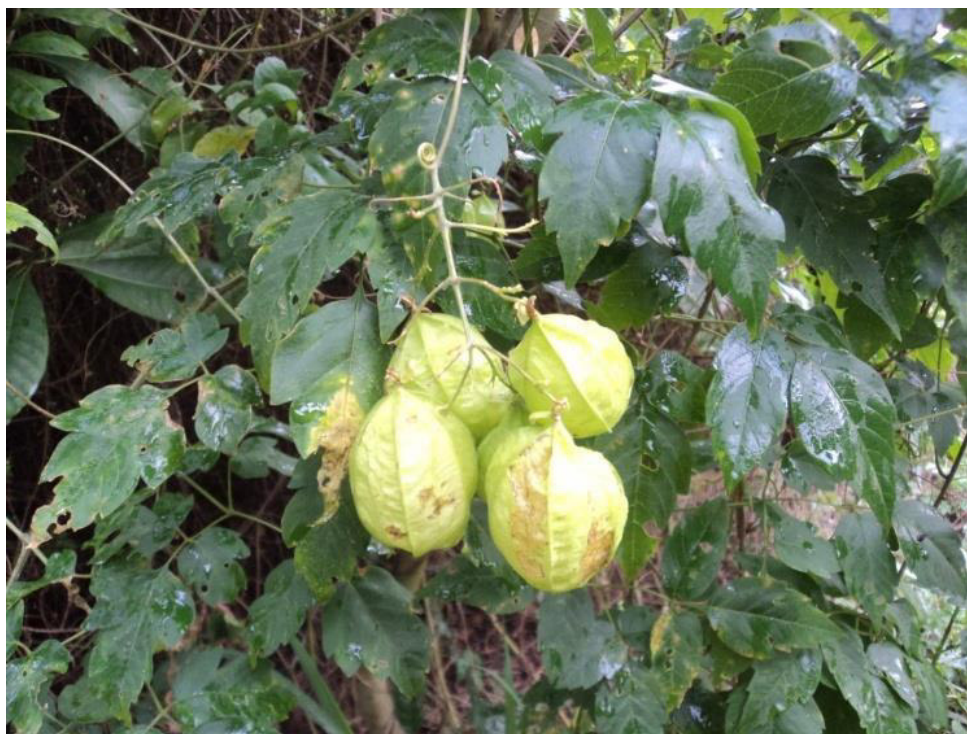
3.4 *Cardiospermum grandiflorum* (Sapindaceae)

3.4.1 Etude botanique

- Nom scientifique : *Cardiospermum grandiflorum* Sw.
- Synonymes : *Cardiospermum barbicaule* Bak., *Cardiospermum caillei* A. Chev., et *Cardiospermum hirsutum* Willd
- Noms vernaculaires :
 - Wolof : Gobu
 - Bambara : nungu
 - Dida : plihoulipiti
 - Ibo : Nri-ewu
 -

3.4.2 Systématique et caractère morphologique

Liane herbacée à ligneuse, pérenne, pouvant atteindre jusqu'à 10 m de long. Les feuilles (15 à 20 cm de long) sont composées de plusieurs folioles. Les folioles mesurent entre 2,5 et 10 cm de long ; la foliole terminale est plus grande que les 2 latérales, elle peut mesurer jusqu'à 10 cm de long et 4,5 cm de large. Les inflorescences sont odorantes peuvent atteindre 1,5 cm de diamètre (**Aluka, 2008**) (Figure 9).



(Source Touré D. 2012)

Figure 9: *Cardiospermum grandiflorum* plantes entière et boutons floraux

3.4.3 Distribution/ Habitat

C. grandiflorum se développe dans les milieux perturbés semi-humides à humides en régions côtières tempérées chaudes, subtropicales et tropicales. Elle est surtout présente le long des cours d'eau et en lisière des forêts hygrophiles (PIER, 2007).

3.4.4 Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

Les différents extraits issus des feuilles, des tiges et des racines sont connus pour leurs nombreuses applications en médecine traditionnelle (Aluka, 2008).

En Côte d'Ivoire, elle est utilisée par les populations locales dans le traitement des diarrhées, des œdèmes, du diabète et les infections bactériennes (Adjanohoun & Aké-Assi, 1979). Les feuilles, les racines et les graines sont largement utilisées dans les médecines traditionnelles pour le traitement de diverses maladies, tels que l'arthrite, l'aménorrhée, la neuropathie, les rhumatismes, les œdèmes, des complications pulmonaires, la paralysie des membres, les morsures de serpents, les troubles nerveux, les diarrhées, le diabète, les convulsions et les infections bactériennes (Aluka, 2008; Bansa, 2007). L'usage des racines comme laxatif, émétique ou encore diurétique et des feuilles contre les œdèmes et les complications pulmonaires ont été rapportés (Aluka, 2008).

3.4.5 Constitutions chimiques et données pharmacologiques

3.4.5.1 Constituants volatils

Les travaux sur *C. grandiflorum* dans la littérature ne montrent pas de résultats concernant les rendements et la composition chimique des huiles essentielles à ce jour. Cependant la présence d'huile essentielle dans une espèce voisine *Cardiospermum halicacabum* (Linn), a été mise en évidence (Alma, 2008).

3.4.5.2 Données phytochimiques

Des nombreuses études phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Cardiospermum* ont été décrites. L'étude photochimique de *Cardiospermum halicacabum* a permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés tels que les flavones, les aglycones, les terpénoïdes, les glycosides, les acides gras et les esters (Mojab, 2003, Parekh, 2007). La présence des alcaloïdes, des sucres réducteurs, des saponines, des phytostérols, des phénols, des flavonoïdes et des terpénoïdes a été mis en évidence dans les feuilles et tiges de *Cardiospermum corindum* collectés au Botswana en Afrique. L'extrait aqueux de cette plante est connu pour ses propriétés contractiles sur l'utérus chez le rat (Zihiri et Mansoor, 1996).

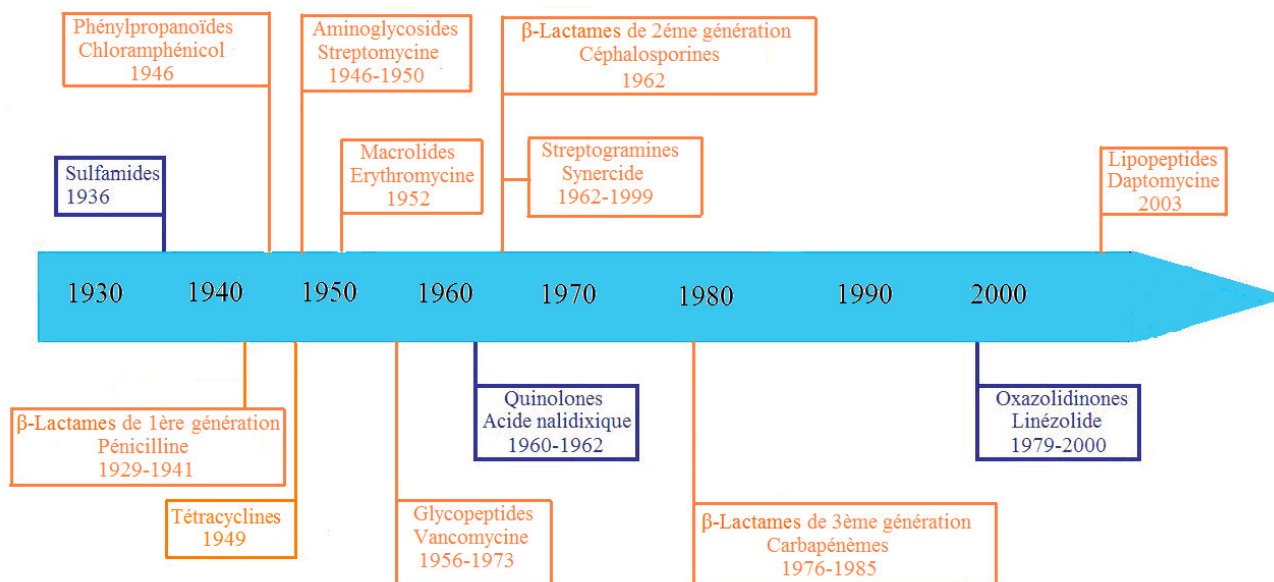
4. Antibiotiques et résistance microbienne

4.1 Antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott *et al.*, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides». L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé.

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962 (Figure 10).



(Singh & Barrett, 2006)

Figure 10: Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique

- Antibiotiques d'origine naturelle
- Antibiotiques d'origine synthétique

4.1.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman *et al.*, 2003 ; Singh & Barrett, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des microorganismes.

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962. La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium notatum*, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β-lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β-lactames de deuxième génération. Une troisième génération de β-lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes.

Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones) a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un antipaludéen en 1962 (Singh & Barrett, 2006). Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques. Découverte en 1979, celle-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années.

4.1.2 Antibiotiques classiques et leurs cibles dans des cellules bactériennes

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métabolites des bactéries. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (Figure 11). La complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels, qui entrent dans la constitution des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette spécificité, associée la capacité d'adaptation des bactéries, participe, entre autres facteurs, à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.

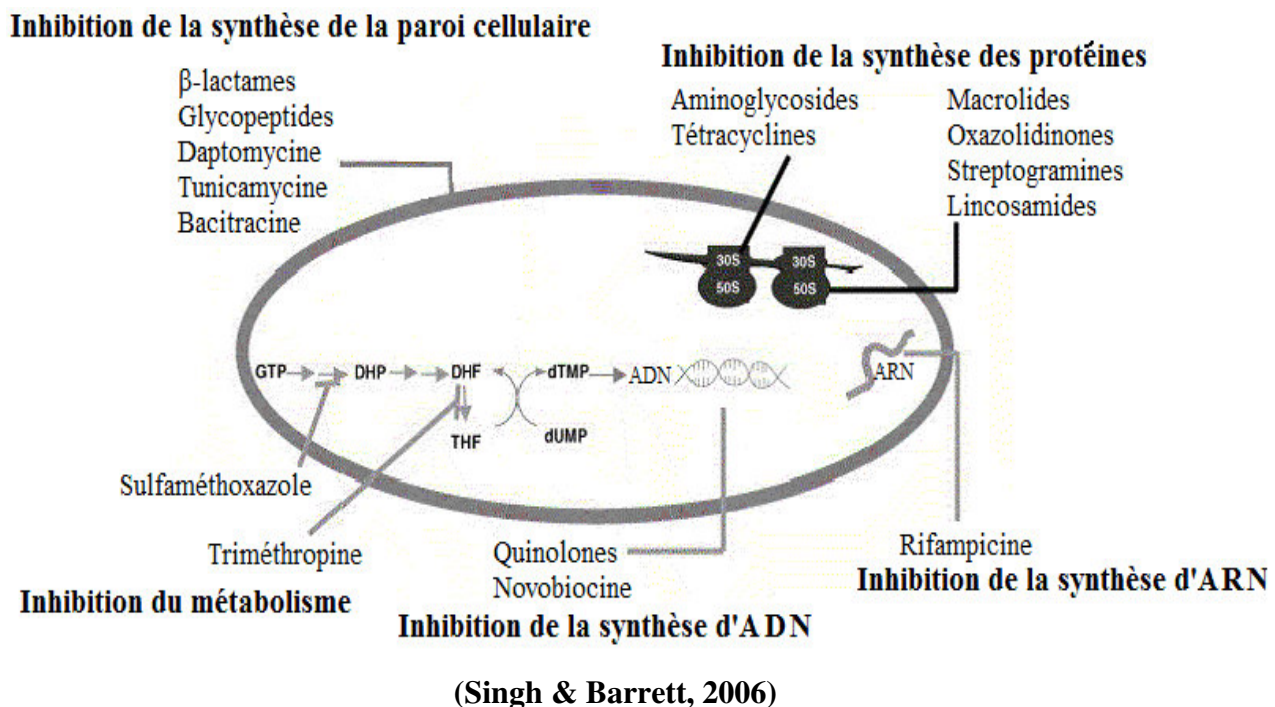


Figure 11 : Mode d'action des antibiotiques.

4.2 Résistance aux antibiotiques

Bien qu'ils aient permis l'un des progrès les plus spectaculaires de la médecine du XXe siècle, les antibiotiques qualifiés de médicaments miracles perdent leur efficacité à un rythme inquiétant (**Ros, 1999**). La lutte contre les maladies infectieuses n'est plus une question de choix de molécule, de stratégies vaccinales et d'allocation de ressources comme le laissait croire la période faste des années 1960, riche en développements et en mises sur le marché de médicaments anti-infectieux dans les pays industrialisés. Ce phénomène n'est pas homogène dans le monde. A côté d'une surconsommation et de mauvais usages, une multiplicité de facteurs interviennent.

La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes. En effet, toutes les cellules réagissent aux perturbations extérieures de manière à préserver les aspects fondamentaux de leurs identités (**Margulis., 1989**). La confrontation à un antibiotique représente du point de vue des bactéries, un formidable stimulus d'évolution (**Hamilton-Miller, 2004**).

4.2.1 Différents types de résistances

Deux types de résistances existent : la résistance naturelle et la résistance acquise.

4.2.1.1 Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs qui conditionnent la résistance naturelle. C'est le cas des bactéries du genre *Mycoplasma sp.* Le composant principal de la paroi des bactéries est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (**Normak & Normak, 2002**).

4.2.1.2 Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. Le facteur principal favorisant l'évolution et l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation.

La dissémination des gènes de résistance peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron vanA, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun & Levy, 2007).

4.2.2 Mécanismes biochimiques de résistance

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances.

4.3.2.1. Modification de l'antibiotique

Plusieurs enzymes modifiant les antibiotiques ont été décrites, incluant les bêta-lactamases, les enzymes modifiant les aminoglycosides ou les chloramphénicol acétyltransférases. Bien que ces enzymes soient, dans beaucoup de cas acquises, quelques-unes sont intrinsèques à certaines espèces. En général, ces enzymes confèrent un niveau élevé de résistance aux antibiotiques contre lesquels ils sont actifs. Ainsi, par exemple, l'expression de TEM-1 β -lactamase par *E. coli* peut augmenter la concentration minimale inhibitrice de l'ampicilline de 8 $\mu\text{g/mL}$ à 10000 $\mu\text{g/mL}$ (Rice *et al.*, 2003).

4.3.2.2. Modification de la cible

Comme l'interaction entre l'antibiotique et la molécule cible est assez spécifique, de faibles altérations de la cible peuvent avoir des effets importants sur la liaison de l'antibiotique. Un exemple de ce mode de résistance est la modification des PBPs qui peut affecter l'affinité de ces

molécules pour les β -lactames. Alors que la modification des PBPs semble être le mécanisme principal de résistance aux β -lactames chez les bactéries Gram positif, la production de β -lactamases est surtout impliquée chez les Gram négatif (**Walsh, 2003**).

D'autres exemples de modification de cibles concernent l'altération des précurseurs de la paroi cellulaire conférant la résistance aux glycopeptides, la mutation de l'ADN gyrase et de la topoisomerase IV conférant la résistance aux fluoroquinolones, les mécanismes de protection ribosomale conférant la résistance aux tétracyclines, les mutations de l'ARN polymérase conférant la résistance à la rifampicine. Le degré de résistance conférée par les modifications de cible est variable et dépend de la capacité de la cible mutée à accomplir ses fonctions (**Rice *et al.*, 2003**; **Murray *et al.*, 2009**).

4.3.2.3. Accessibilité réduite de la cible

L'antibiotique doit atteindre la cible pour agir et, lorsqu'il doit traverser des barrières pour y arriver, celles-ci constituent un mécanisme de résistance efficace. Toutes les bactéries gram négatif ont une membrane externe qui doit être franchie avant d'atteindre la membrane cytoplasmique. Il a été reporté que la réduction des porines contribue à la résistance à certains antibiotiques. Dans beaucoup de cas, cette accessibilité réduite doit être associée à la production d'au moins une β -lactamase d'activité modérée pour obtenir un niveau élevé de résistance aux β -lactames (**Murray *et al.*, 2009**). Les barrières d'entrée peuvent aussi exister dans la membrane cytoplasmique. Le mouvement des aminoglycosides à travers la membrane cytoplasmique est un processus oxygène-dépendant, ainsi ces antibiotiques sont-ils inactifs dans un environnement anaérobie (**Rice *et al.*, 2003**).

4.3.2.4. Les systèmes d'efflux bactériens

Les premiers cas de résistance par efflux ont été mis en évidence pour des agents chimiothérapeutiques, efflués par la glycoprotéine P des cellules cancéreuses de mammifères (**Juliano & Ling, 1976**). L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (**Levy & Mc Murry, 1978**). Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Tel est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides (**Markham & Neyfakh, 2001**). Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR : multi-résistance aux drogues) des bactéries

vis-à-vis des antibiotiques (**Poole, 2004**). Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (**Butaye et al., 2003**).

Chez les bactéries Gram négatif, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein). Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont les pompes AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *P. aeruginosa*. Chez les bactéries Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes NorA ou QacA, chez *S. aureus*, et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae*.

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par la dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, SMR et RND) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC).

5. Place des plantes dans la lutte contre la résistance

Les nouveaux composés actifs peuvent être recherchés dans les plantes médicinales, car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes :

- formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ;
- rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes, défensives)
- inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes) provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bêtalactamases (alkyls gallates).

MATERIEL & METHODES

1. Matériel

1.1 Matériel végétal et huiles essentielles

Les fleurs et tiges de *Ageratum conyzoides*, les feuilles et tiges de *Croton hirtus* et les parties aériennes de *Cardiospermum grandiflorum* ont été récoltées à Bobia. Le village de Bobia est situé dans la sous-préfecture de Gagnoa dans le Centre Ouest de la Côte d'Ivoire. Alors que les feuilles de *Chromolaena odorata* ont été récoltées à Akouédo, une commune située à l'Est de la ville d'Abidjan. L'ensemble des récoltes des plantes ont été effectuées au mois de décembre 2012. Elles ont été identifiées par le Centre National de Floristique (CNF) d'Abidjan.

Toutes les plantes ont été débarrassées de tous éléments étrangers, placées dans des sacs et transportées au laboratoire dans les 24 heures qui ont suivi la récolte. Les huiles essentielles ont été par la suite extraites et ce sont elles qui ont servi à réaliser la suite de l'étude (détermination de la composition chimique, activités biologiques et biochimiques). Leur solubilisation a été réalisée dans du Tween 80 ou dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO), ils sont sans effet sur la croissance bactérienne.

1.2 Souches bactériennes

Les tests antibactériens ont été effectués sur des souches cliniques et des souches de référence. Les souches cliniques ont été isolées de divers produits biologiques au laboratoire de bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, il s'agit des souches suivantes :

Enterococcus faecalis 469C/13, *Salmonella enterica* 548C/13, *Klebsiella pneumoniae* 444C/13, *Shigella* sp 745/13, *Pseudomonas aeruginosa* 1289C/13, *Staphylococcus aureus* 524C/13, *Shigella* sp 436C/13, *Staphylococcus aureus* 408C/13, *Citrobacter koseri* 745C/13, *Enterobacter cloacae* 409C/13, *Enterobacter aerogenes* 746 C/13, *Enterococcus faecalis* 469C/13, *Salmonella enterica* 548C/13, *Klebsiella pneumoniae* 444C/13, *Shigella* sp 745C/13, *Pseudomonas aeruginosa* 1289/13, *Staphylococcus aureus* 524C/13, *Citrobacter koseri* 745C/13.

Les souches de références ont été : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, *Escherichia coli* ATCC 25 922.

Les souches bactériennes ont été conservées à la température ambiante dans des tubes contenant 3 mL de milieu incliné (géloses de conservation).

1.3 Milieux de culture

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, le bouillon cœur cerveau a été utilisé comme milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes. Pour obtenir des colonies jeunes des bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles, plusieurs milieux ont été utilisés : la gélose cétrimide pour *Pseudomonas aeruginosa*, la gélose Chapman pour les souches de *Staphylococcus aureus*, la gélose Salmonella Shigella ou Hektoen pour *Salmonella* et *Shigella*, la gélose Eosine Bleu de Méthylène pour les entérobactéries. Et la gélose Bile Esculine Azide pour les souches de *Enterococcus faecalis*. Pour l'activité antibactérienne le bouillon et la gélose Mueller Hinton ont été utilisés. En effet il s'agit d'un milieu non sélectif et qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques. Tous les milieux de culture sont de BioRad®.

Pour les méthodes de diffusion en milieu solide, 18 mL du milieu en surfusion sont réparties dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre afin d'obtenir une épaisseur de 4 mm. Avant solidification de la gélose, les boîtes ont été disposées sur une surface plane afin d'assurer une bonne uniformisation de la surface de la gélose.

De plus, tout le "nécessaire d'épreuve" (pipettes, micropipettes, boîtes de Pétri, etc.) pour les tests bactériologiques ont été utilisés pour la réalisation des activités microbiologiques.

1.4 Antibiotiques

Les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion sont : Céfépime 30 µg (FEP), Ceftriaxone 30 µg (CRO), Cefoxitine 30 µg (FOX), Amoxicilline + Acide Clavulanique 30 µg (AMC), Céfixime 10 µg (CFM), Amoxicilline 25 µg (AMX), Céfaloïne 30 µg (CF), kanamycine 30 µg (K), Gentamicine 15 µg (GM), Amikacine 30 µg (AN), Nétilmicine 30 µg (NET), Piperacilline 75 µg (PIP), Minocycline 30 µg (MNO), Chloramphénicol 30 µg (C), Colistine 50 µg (Cs), Tétracycline 30 µg (TE), Rifampicine 30 µg (RA), Norfloxacin 5 µg (NOR), Ciprofloxacine 5 µg (CIP), Imipénème 10 µg (IPM), Mécilline 10 µg (MEC), Sulfaméthoxazole-triméthoprim 25 µg (SXT), Acide nalidixique 30 µg (NA), Céfuroxime 30 µg (CXM), Oxacilline 5 µg (OX), Lincomycine 15 µg (LCN), Erythromycine (E), Pristinamycine 15 µg (P), Vancomycine 30 µg (VA), Teicoplanine 30 µg (TEC), Pipéracilline 75 µg (PIP), Tobramycine 10 µg (TOB), Aztréonam 30 µg (ATM), Ticarcilline 75 µg (TIC), Ticarcilline +Acide Clavulanique 17 µg (TICC), Sulfamide 200 (SSS) et Fosfomycine 50 µg (FOS).

Ces antibiotiques sont du fabricant Bio Rad. Les antibiotiques utilisés pour la réalisation de la gamme de dilution sont la Gentamicine et la Ceftazidime.

1.5 Solvants et réactifs

Les solvants utilisés dans ce travail sont les suivants : l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'hexane et le méthanol, le Tween 80, le diméthylsulfoxyde (DMSO). Tous ces solvants étaient de grade analytique et fournis par Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Ils ont servi à réaliser les différents extraits.

1.6 Appareils

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des appareils suivant :

- Hhydrodistillateur de type clevenger, pour l'extraction des huiles essentielles
- Chromatographe en phase gazeuse de type Delsi DI 200 muni d'un détecteur à ionisation de flamme, pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles.
- Etuve bactériologique à 37°C
- Automate ADAGIO de type BIO-RAD, pour les antibiogrammes en milieu solide
- Spectrophotomètre de type UV-VIS de marque BioMérieux, pour la mesure des densités optiques.

2. Méthodes

2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction (Figure 12).



Figure 12: Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles

2.1.1 Hydrodistillation

L'hydrodistillation ou entraînement à la vapeur, est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (**Bruneton., 1999**).

2.1.2 Méthode de l'hydrodistillation utilisée

Trié et nettoyé, 500 g de matériel végétal frais ont été placé sur une grille métallique et introduite dans une cocotte minute contenant 850 mL d'eau. Cet ensemble est porté à ébullition pendant deux heures (**Kouamé, 2012**) et les huiles essentielles sont entraînées à la vapeur d'eau. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmontant l'eau (non miscible) est séparée de l'eau, puis séchée par congélation. Après extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un flacon en verre bien bouché. Le flacon a été couvert d'un papier aluminium à

l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

2.1.3 Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile a été estimé par rapport au volume de l'huile essentielle et de la masse de matière végétale fraîche. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$RdtHE = \frac{VHE}{MVF} \times 100$$

Rdt HE: Rendement en huile essentielle (%)

VHE : Volume d'huile essentielle (mL)

MVF: Masse de matériel végétal frais (g)

2.2. Méthodes chromatographiques préparatives

2.2.1. Fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice

Le fractionnement des huiles essentielles de *Chromoleana odorata* a été réalisé sur une minie colonne chromatographique de la taille d'une seringue de 5 mL utilisée en chimie fine (Figure 13).



Figure 13: Dispositif utilisé pour le fractionnement des huiles essentielles

L'absorbant choisi a été une silice de fine granulométrie 70-200 μm (Merck). L'élution a été réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.

Environ 10,00 g d'huile essentielle de *C. odorata* ont été élués par un gradient hexane/acétate d'éthyle selon les proportions suivantes : 100/0 ; 95/5 ; 5/95 et 0/100. Ces mélanges ont été choisis suite aux résultats obtenus pour les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées préalablement sur l'huile brute. Quatre fractions ont ainsi été obtenues, et analysées à la fois par CCM, afin d'affiner leur regroupement.

2.2.2. Chromatographie préparative sur couche mince

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de silicagel G60 ; 0.25 mm, sur support rigide ; 20/20cm.

Les fractions d'huile essentielle de *C. odorata* ont été déposées sur la plaque à l'aide de pipette pasteur à des points repères situés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque. La plaque a été placée dans une cuve saturée de vapeur de mélange de solvants appropriés. Ensuite, les plaques ont été révélées dans l'iode. Les fractions identiques ont été regroupées. Ce qui a permis la récupération de quatre fractions qui vont faire l'objet de tests antibactériens.

2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de chimie des Hétérocycles et des Glucides à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand.

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse et ensuite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse pour la détermination de leur composition.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe (Delsi DI 200), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne DB5 (25m x 0,25 mm, df: 0,25 μm) avec un débit de 60 mL/min. L'azote a été utilisé comme gaz porteur. La programmation de la température a été à 50°C pendant 5 min et à 30°C/min jusqu'à 220°C. La température de l'injecteur a été fixée à 220°C et celui du détecteur à 250°C.

Les analyses des huiles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ont été effectuées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett-Packard modèle 6890) couplé à un modèle Hewlett-Packard MS 6890 équipé d'une colonne HP5 (30 m x 0,25 mm df: 0,25 μm) programmé à 50°C (5 min) et à 50°C/min jusqu'à 300°C (température

stabilisée pendant 5 min. Le gaz porteur à 1,0 mL/min). L'injection a été définie en mode split avec un rapport de division 1/10. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été à 250 °C et 320 °C respectivement. L'ionisation a été effectuée par impact d'électrons à 70 eV, le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V et la température de source d'ions est de 230°C. Les données du spectre de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme de m/z 33-450.

L'identification des composés a été réalisée par calcul des indices de rétention (RI) ou Indices de Kovats (KI) et ont été comparés avec ceux des spectres de masse dans les banques de données, Adams (2001) ou Mc Lafferty & Stauffer (1994).

2.3. Activités biologiques

2.3.1. Activités antibactériennes des huiles essentielles

2.3.1.1 Préparation de l'*inoculum* bactérien

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches bactériennes utilisées puis incubés à 37°C pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après ce temps d'incubation, 1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant 2 mL d'eau physiologique puis agiter au vortex. La densité de l'*inoculum* a été ajustée à 0,5 Mc Farland grâce à un DENSIMAT. L'*inoculum* ainsi réalisé est dilué dans de l'eau physiologique en fonction du type de germes :

- Pour Pseudomonas, 10 µL de l'*inoculum* est dilué dans 10 mL d'eau physiologique.
- Pour Entérobactéries, 100 µL de l'*inoculum* est dilué dans 10 mL d'eau physiologique.
- Pour Staphylocoques, 1000 µL de l'*inoculum* est dilué dans 10 mL d'eau physiologique.

Cette dilution nous a permis d'avoir une suspension bactérienne à 10⁶ UFC/mL.

2.3.2. Méthodologie des tests antibactériens

2.3.2.1 Antibiogramme en milieu solide

L'étude de la sensibilité des bactéries a été réalisée par la méthode de disque ou antibiogramme standard. Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papiers buvard imprégnés des antibioques à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé avec une culture pure.

2.3.2.1.1. Ensemencement

Dans les boîtes de Pétri, deux à quatre millilitres de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton puis homogénéisés dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée.

La suspension bactérienne est laissée au contact de la gélose pendant 1 mn puis l'excès de suspension est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile surmontée de poire. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 mn à la température du laboratoire.

2.3.2.1.2. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bensen, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la boîte gélosée de Mueller-Hinton précédemment encensé. La boîte gélosée ainsi préparée est maintenue à la température du laboratoire pendant 30 mn afin de permettre la pré-diffusion. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 24 heures pour la lecture.

2.3.2.1.3. Lecture

La mesure des diamètres d'inhibition et la détermination des phénotypes des souches étudiées ont été réalisées avec le logiciel ADAGIO.

2.3.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour évaluer cette activité, nous avons utilisés deux méthodes différentes :

- La méthode de diffusion de disque
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les CMI

2.3.3.1. Méthode de diffusion de disques

Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une modification de la méthode de **Hayes & Markovic (2002)**. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique ou substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On

observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère & Avril, 2002).

Pour la réalisation technique du travail, deux millilitres d'*inoculum* sont déposés sur chaque boîte gélosée. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'*inoculum* a été éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte, quatre disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (bioMérieux) ont été déposés. Au cours de l'opération, deux essais ont été réalisés : 20 µL d'huile essentielle supplémentée de 10% de DMSO. Deux témoins ont été réalisés : un témoin négatif avec 20 µL d'eau distillée stérile en présence de 10% de DMSO et un disque de gentamicine (15µg) comme témoin positif. Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres disque inclus.

2.3.3.2. Technique de microdilution en milieu liquide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMI) ont été déterminées en utilisant la technique de microdilution avec le bouillon Muller Hinton (NCCLS, 2000). Les rendements en huile essentielle étant faibles pour l'ensemble des plantes (< 1%), la technique de microdilution en milieu liquide a été choisie.

2.3.3.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Pour réaliser cela, 3 à 5 colonies d'une culture bactérienne de 18 à 24 heures ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis délayées dans 10 mL de bouillon Muller Hinton, puis incubés pendant 3 à 5 heures à 37°C après cela, nous avons prélevé :

- 0,3 mL pour les *staphylocoques* et *Pseudomonas*
- 0,6 mL pour les *enterococcus*
- 0,1 mL pour les bactéries à Gram négatif.

Que nous avons délayé dans 10 mL de bouillon Muller Hinton.

Une telle procédure, nous permet d'avoir une suspension bactérienne dont la charge est de 5.10^6 bactéries par millilitre de solution (condition standard). Pour faciliter la miscibilité des huiles essentielles dans le milieu liquide, nous avons utilisé le Tween 80 à raison de 90% d'huile essentielle pour 10 % de tween 80 (Oussou et al., 2008). Le tween a servi de dispersant des huiles dans l'eau. Il est à la fois miscible à l'huile et à l'eau. Les extraits d'huiles essentielles dissouts dans le tween 80 (1/10) sont préparés par pesée et par ajout de volume nécessaire d'eau distillée pour obtenir une suspension mère à 1024 µg/mL. La solution ainsi obtenue est agitée au vortex pendant 3

min de sorte à avoir une bonne homogénéisation. L'huile a été ensuite dissoute dans des tubes stériles contenant de l'eau distillée, de manière à générer une dilution de raison 2. La gamme de concentration de 0,5 à 1024 µg/mL a été ainsi obtenue.

Les microplaques (Greiner, VWR) comportent 96 puits, repartis en 8 rangées de 12 colonnes. Dans la première colonne de chaque microplaque, nous avons disposé 200 µL de bouillon, elle a servi à contrôler d'une éventuelle contamination du milieu de culture. La deuxième colonne comportant 190 µL de bouillon, il a servi après inoculation, à contrôler la qualité de la croissance de la souche bactérienne. La septième a été réservée au Tween 80 comme témoin négatif. La huitième colonne a été réservée à l'antibiotique témoin positif la gentamicine. Cent microlitres de chaque concentration de la gamme de dilution de l'huile essentielle préparée ont été déposés dans chacun des puits contenant 90 µL de bouillon Mueller Hinton ; puis à ce mélange, 10 µL de *l'inoculum* ont été ajoutés au contenu de chaque cupule. Le volume final (milieu de culture+*inoculum* et huile essentielle) de tous les puits a été de 200 µL. Les concentrations finales de la gamme d'huile essentielle ainsi générées sont comprises entre 512 et 0,25 µg/mL. Les plaques sont ensuite recouvertes puis incubées à 37°C. La CMI de l'huile essentielle a été déterminée après 18 à 24 heures d'incubation à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne visible.

2.3.3.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide

Elle a été réalisée en deux étapes étalées sur deux jours. Le premier jour, *l'inoculum* ayant servi à la détermination de la CMI a été dilué à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Ceci correspond à partir de *l'inoculum* initial à 100%, 1%, 0,1%, 0,01% et 0,001% de survivants suivants, respectivement. *L'inoculum* initial et chaque dilution ont été ensemencés en stries de 5 cm sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton. La boîte a été mise à incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le jour suivant, après lecture de la CMI, nous avons refait un ensemencement en stries de 5 cm chacune à partir des cupules où il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu. Pour chaque extrait, les boîtes de Pétri ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Ensuite, nous avons compté le nombre de bactéries vivantes pour chaque cupule. La concentration de la cupule qui aura moins de 0,01% de bactéries viables par rapport à *l'inoculum* initial, sera la CMB.

2.3.3.3. Test de synergie entre l'huile essentielle de *Croton hirtus* et deux antibiotiques

Pour sa réalisation, nous avons utilisé les deux méthodes précédemment citées en mettant en évidence l'effet synergique entre l'huile essentielle de *C. hirtus* et la Ceftazidime d'une part et la gentamicine d'autre part.

2.3.3.3.1. Méthode de diffusion de disques

Après inondation des boîtes ; des disques de gentamicine et de ceftazidime (deux de chaque) sont déposés à la surface des géloses. Ensuite, nous avons ajouté à l'un des disques de gentamicine et de ceftazidime, 20 μ L d'huiles essentielles préalablement dissoutes dans le DMSO. Tans disque le second des deux disques est dépourvu d'huiles essentielles.

Les boîtes de Pétriensemencées ont été laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres disque inclus. La combinaison a été considérée comme synergique lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur à 5 mm (**Ahmad et al., 2007**).

2.3.3.3.2. Méthode de microdilution en milieu liquide

La détermination de la CMI a été réalisée selon la méthode rapportée par **Thiago et al** en 2013. Le mode opératoire de ce test est basé sur celui de microdilution décrite plus haut. Le bouillon cœur cervelle à 10% a été préparé dans de l'eau distillée stérile. L'huile essentielle est ajoutée au bouillon de sorte à obtenir une concentration (CMI/8) de 64 μ g/mL (**Thiago, 2013**). Le bouillon ainsi supplémenté avec l'huile essentielle a servi pour le test de synergie.

Des solutions mères des antibiotiques (gentamicine et de ceftazidime) ont été préparées à 1000 μ g/mL le même jour, puis une série de dilution de raison 2 allant de 0,0012 à 2,5 mg/mL a été réalisée.

Dans la première colonne de chaque microplaque, nous avons disposé 200 μ L de bouillon supplémenté d'huile essentielle, elle a servi à contrôler une éventuelle contamination du milieu de culture. La deuxième colonne comporte 190 μ L de bouillon, a servi après inoculation, à contrôler l'absence de la croissance de la souche bactérienne. Elle n'a pas été touchée par dilution des antibiotiques. La septième et la huitième colonne ont été réservées à la gentamicine et à la ceftazidime. Pour chaque antibiotique, nous avons déposé 100 μ L de la gamme de dilution préalablement réalisé dans chacun des puits contenant préalablement 90 μ L de bouillon supplémenté d'huile essentielle à 64 μ g/mL. Pour terminer, nous avons ajoutés 10 μ L de *l'inoculum* au contenu de chaque cupule. Le volume final (milieu de culture+*inoculum* et huile essentielle) de tous les puits a été de 200 μ L. Les plaques ont été ensuite recouvertes puis incubées à 37°C. La CMI de l'huile essentielle est déduite après 18 à 24 heures d'incubation à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne visible.

2.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

Deux méthodes ont été choisies pour leur facilité de mise en œuvre et leur fiabilité pour l'évaluation de l'activité antioxydante des HE. Il s'est agi du test au 1,1-Diphényl -2- picrylhydrazyle (DPPH) et celui de FRAP.

2.4.2.1 Préparation de la solution de DPPH

Le 1,1-Diphényl -2- picrylhydrazyle (DPPH) est solubilisé dans du méthanol absolu à raison de 2,4 mg dans 100 mL.

2.4.2.2 Solutions d'huiles essentielles

Pour les tests antioxydants, les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. Pour toutes les huiles essentielles, on prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 0,1 mg/mL pour l'huile essentielle de *C. grandiflorum* et 10 mg/mL pour l'huile essentielle de *A. conyzoides*, *C. hirtus* et *C. odorata*. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par mL (Tableau I).

	Huiles essentielles			
	<i>A. conyzoides</i>	<i>C. hirtus</i>	<i>C. grandiflorum</i>	<i>C. odorata</i>
Concentrations μg/mL	19,53	19,53	0,05	19,53
	39,06	39,06	0,1	39,06
	78,12	78,12	0,2	78,12
	156,25	156,25	0,39	156,25
	312,5	312,5	0,78	312,5
	625	625	1,56	625
	1250	1250	3,13	1250
	2500	2500	6,25	2500
	5000	5000	12,50	5000
	10000	10000	25	10000

Tableau I: Concentrations testées dans les tests antioxydants

2.4.2.3 Piégeage du radical DPPH

Cette méthode reste largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes végétales. Elle vise à mesurer la capacité de l'huile à piéger le radical relativement stable, 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Le piégeage des radicaux libres de DPPH provoque un changement de couleur de la solution initiale du violet foncé au jaune suite à la réduction du DPPH en DPPH-H (diphényl-picrylhydrazine). La mesure de l'activité anti radicalaire des extraits de plantes a été effectuée par le test au 1,1 Diphényl-2- picrylhydrazyle (DPPH) selon la méthode de **Parejo *et al.*, (2000)**.

Ainsi, à partir d'une solution mère d'huile essentielle de 0,1 mg/mL, des solutions filles (diluées) de concentrations ont été préparées par double dilution successive dans du méthanol. Puis à chaque concentration, un volume de solution méthanolique de DPPH a été ajouté. Les mélanges ont été agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min à la température du laboratoire. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc (solution d'éthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV-VIS de marque BioMérieux. La vitamine C (0,1 mg/mL) qui est la substance de référence a été préparée dans les mêmes conditions puis utilisée comme étalon. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical libre DPPH est calculé selon la formule suivante.

$$I (\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Avec :

I % : Le pourcentage d'inhibition

A₀ : Absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'huile (T= 0 min)

A: Absorbance de l'échantillon contenant une dose d'huile testée (T= 30 min)

La valeur de la concentration inhibitrice CI₅₀ représente la dose de l'huile essentielle qui neutralise 50% des radicaux de DPPH. La CI₅₀ utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I %) en fonction des concentrations (C).

2.4.2.4 Mesure du pouvoir réducteur

L'activité réductrice du fer des extraits préparés a été déterminée selon la méthode décrite par, basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺ (**Yildirim *et al.*, 2001**). A 1 mL de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon

phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain Marie à 50°C pendant 30 mn. Par la suite 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% y sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 mn, puis 2,5 mL du surnageant recueilli sont mélangés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de chlorure ferrique 0,1% préparée extemporanément.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel s'est faite à 700 nm contre un blanc identiquement préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui a permis de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif a été représenté par une solution d'acide ascorbique (un antioxydant standard) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Benzie *et al.*, 1996**).

RESULTATS & DISCUSSION

1. Résultats

1.2 Etude chimique

1.2.1 Rendement en huile essentielle

Les extractions par hydrodistillation des différents organes de plantes étudiées ont fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune claire au jaune relativement foncé avec de fortes et persistantes odeurs (Figure 15).

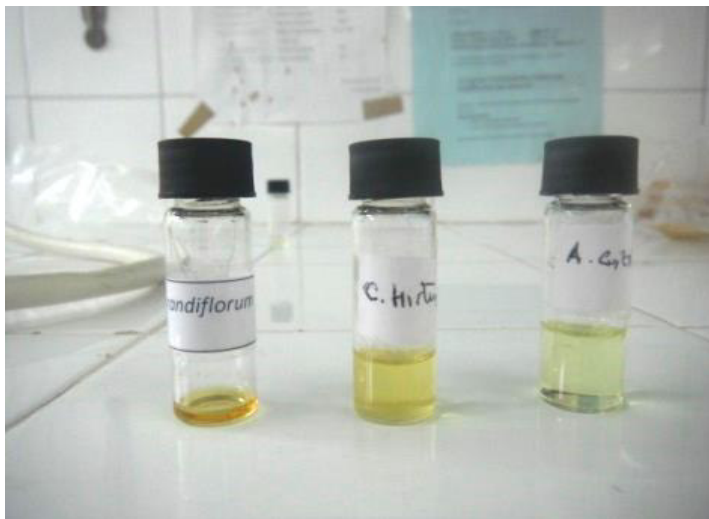


Figure 14: Echantillon d'huiles essentielles de *A. conyzoides*, *C. hirtus* et *C. grandiflorum*

Les valeurs représentant la moyenne des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées varient de 0,08 à 0,60% (Figure 16).

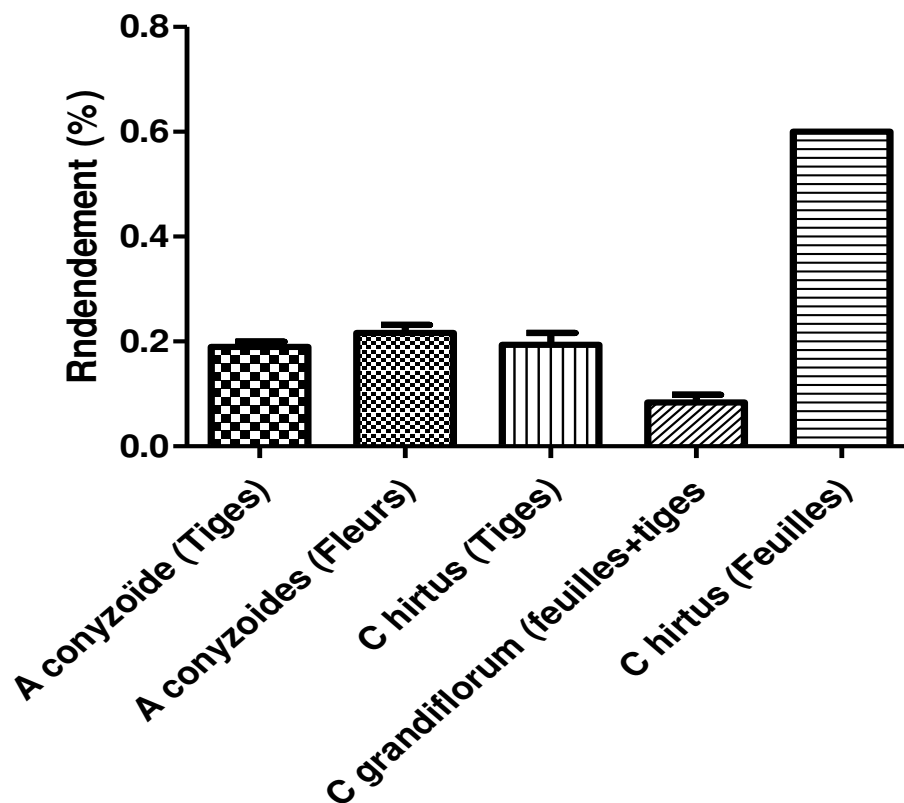


Figure 15: Rendements en huile essentielles de *A. conyzoides* (fleurs et tiges), *C. hirtus* (feuilles et tiges) et *C. grandiflorum* (parties aériennes)

- Pour *A. conyzoides*, le rendement en huile essentielle est de 0,22% pour les fleurs et de 0,19% pour les tiges.
- Pour *Croton hirtus* la teneur en huile essentielle est de 0,60% pour les feuilles et de 0,18% pour les tiges.
- Pour les parties aériennes de *C. grandiflorum*, le rendement est de 0,08%.

Les plantes étudiées contiennent effectivement des huiles essentielles et les rendements en huile essentielle des feuilles de *Croton hirtus* sont les plus élevés.

L'ordre de grandeur des rendements en huile essentielle, se présente comme suit : feuilles de *C. hirtus* > fleurs de *A. conyzoides* > tiges de *A. conyzoides* > tiges de *C. hirtus* > parties aériennes de *C. grandiflorum*.

1.2.2. Etude de la composition chimique des huiles essentielles

1.2.2.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Ageratum conyzoides*

1.2.2.1.1 Fleurs

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *Ageratum conyzoides* a permis d'identifier 50 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0,01%. Ces 50 composés ont une aire cumulée qui correspond 96,24% des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'huile essentielle (Tableau II).

Tableau II: Composition chimique des fleurs de *Ageratum conyzoides*

N°	KI	Constituants	% HE	N°	KI	Constituants	% HE
1	839	Hexanal	0,02	27	1460	(E)-bêta-farnesene	1,58
2	934	alpha pinène	0,06	28	1469	Préconène I	58,78
3	951	Camphene	0,35	29	1474	cadina-1(6),4-diene trans	0,5
4	979	beta pinène	0,04	30	1479	gamma cadinene	0,14
5	990	Myrcene	0,05	31	1486	germacrène-D	2,84
6	999	delta-2-carene	0,3	32	1496	muurola-4(14),5-diene trans	0,88
7	1007	alpha phellandrene	Nd	33	1499	bicyclogermacrene	1,64
8	1030	Limonène	0,13	34	1504	alpha muurolene	0,08
9	1086	Terpinolene	Nd	35	1509	bêta -bisabolene	0,1
10	1100	Linalol	0,04	36	1520	gamma cadinene	0,47
11	1113	(E)-4,8-dimethyl-nona-1,3,7-triene	0,36	37	1526	beta sesquiphellandrene	1,82
12	1175	endo borneol	0,03	38	1545	alpha calacorene	0,02
13	1231	formiate de bornyle	0,19	39	1561	(E)-nerilidol	0,61
14	1286	acetate de bornyle	0,67	40	1581	Spathulenol	0,21
15	1290	Thymol	0,06	41	1587	oxyde caryophyllene	0,73
16	1334	delta elemene	0,03	42	1599	6-acethyl-2,2-dimethylchroman	0,08
17	1353	alpha longipinene	0,25	43	1609	humulene-1,2-epoxyde	0,04
18	1358	Eugenol	0,03	44	1615	1,10-di-epi-cubenol	0,08
19	1379	alpha copaene	0,13	45	1632	1-épi-cubenol	0,08
20	1387	beta bourbonene	0,07	46	1642	caryophylla-4(12),8(13)-diène-5-beta-ol	0,29
21	1390	bêta cubebene	1,06	47	1653	desmethoxy enecaline	1,61
22	1425	beta caryophyllene	15,2	48	1660	ageratochromène	0,12
23	1430	beta copaene	0,03	49	1676	andro enecalinal	2,34
24	1435	alpha trans bergamotene	0,22	50	2107	Phytol	0,09
25	1442	(Z)-bêta-fanesene	0,19			TOTAL	96,24
26	1454	alpha humulene	1,68			Monoterpènes hydrocarbonés	1,31
						Monoterpènes oxygénés	0,99
						Sesquiterpènes hydrocarbonés	30,66
						Sesquiterpènes oxygénés	4,5
						Préconène I	58,78

De façon générale, et sans tenir compte des composés non identifiés, l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des fleurs de *A. conyzoides* a montré une prédominance en précocène I (58,78%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés sont respectivement présents à 30,66 et 4,50%. Parmi les monoterpènes, les hydrocarbonés sont à 1,31% et les oxygénés à 0,99% (Figure 17).

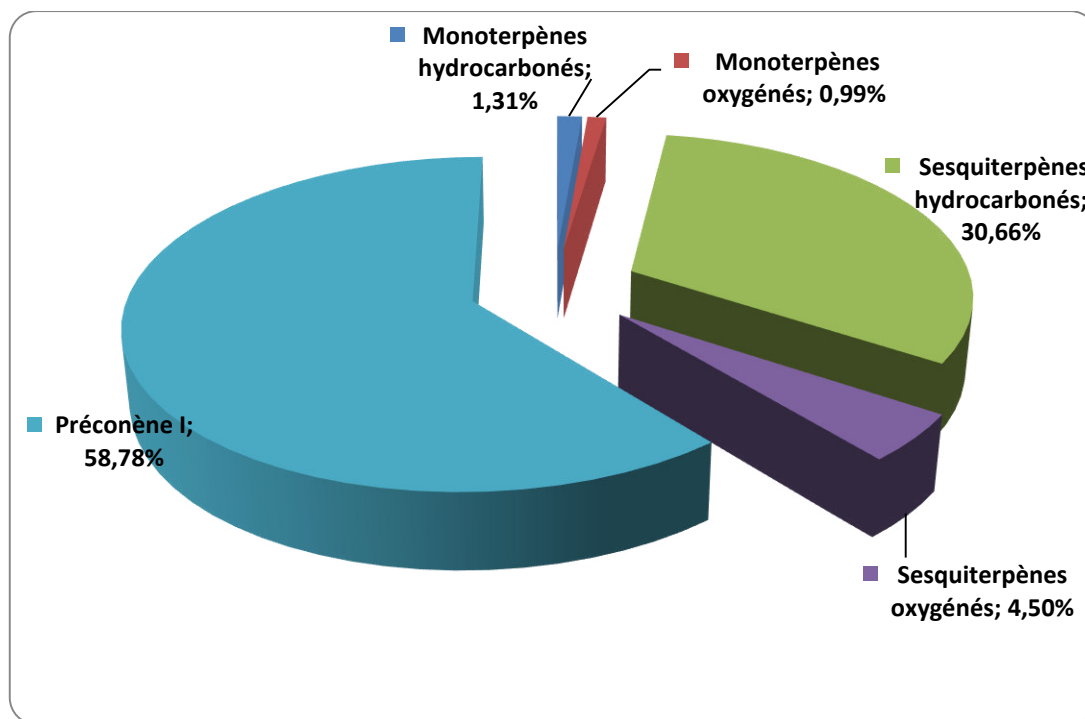


Figure 16: Répartition des familles de molécules présentes dans les fleurs de *Ageratum conyzoides*

Le précocène I 58,78%, le β -caryophyllène (15,20%) et le germacrène-D (2,84%) constituent les composés majoritaires de l'huile essentielle des fleurs de *A. conyzoides*. Les structures chimiques de ces composés sont rapportées à la figure 18.

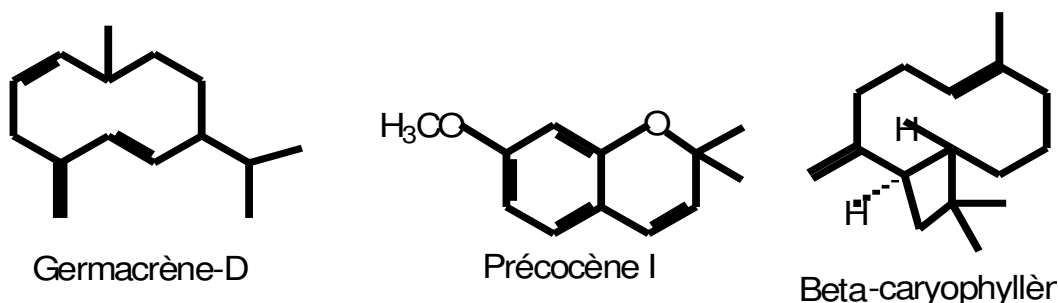


Figure 17: Structures chimiques des composés majoritaires des fleurs de *A. conyzoides*

1.2.2.1.2 Tiges

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle issue des tiges *A. conyzoides* a permis d'identifier 50 composés. Ces 50 composés ont une aire cumulée qui correspond 98,34% des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'huile essentielle (Tableau III).

Tableau III: Composition chimique des tiges de *Ageratum conyzoides*

N°	KI	Composés	% HE	N°	KI	Composés	% HE
1	839	Hexanal	0,03	27	1460	(E)-béta-farnesene	0,54
2	934	alpha pinene	0,21	28	1469	Préconène I	76,46
3	951	Camphene	1,6	29	1474	cadina-1(6),4-diene trans	0,11
4	979	beta pinene	0,17	30	1479	gamma cadinene	0,07
5	990	Myrcene	0,05	31	1486	germacrene-D	0,93
6	999	delta-2-carene	0,91	32	1496	muurola-4(14),5-diene trans	0,21
7	1007	alpha phellandrene	0,03	33	1499	bicyclogermacrene	0,87
8	1030	Limonene	0,47	34	1504	alpha muurolene	nd
9	1086	Terpinolene	0,05	35	1509	beta -bisabolene	0,06
10	1100	Linalol	nd	36	1520	gamma cadinene	0,07
11	1113	(E)-4,8-dimethyl-nona-1,3,7-triene	0,38	37	1526	beta sesquiphellandrene	0,88
12	1175	endo borneol	0,08	38	1545	alpha calacorene	0,02
13	1231	formiate de bornyle	0,49	39	1561	(E)-nerilidol	0,29
14	1286	acetate de bornyle	1,29	40	1581	Spathulenol	0,07
15	1290	Thymol	0,24	41	1587	oxyde caryophyllene	0,35
16	1334	delta elemene	nd	42	1599	6-acethyl-2,2-dimethylchroman	0,04
17	1353	alpha longipinene	0,03	43	1609	humulene-1,2-epoxyde	nd
18	1358	Eugenol	0,04	44	1615	1,10-di-epi-cubenol	0,04
19	1379	alpha copaene	0,03	45	1632	1-épi-cubenol	nd
20	1387	beta bourbonene	nd	46	1642	caryophylla-4(12),8(13)-diène-5-beta-ol	0,06
21	1390	béta cubebene	0,22	47	1653	desmethoxy enecaline	0,22
22	1425	beta caryophyllene	8,06	48	1660	ageratochromène	0,06
23	1430	beta copaene	0,02	49	1676	andro enecalinol	0,87
24	1435	alpha trans bergamotene	0,08	50	2107	Phytol	0,05
25	1442	(Z)-béta-fanesene	0,15			TOTAL	98,34
26	1454	alpha humulene	1,43			Monoterpènes hydrocarbonés	3,90
						Monoterpènes oxygénés	2,10
						Sesquiterpènes hydrocarbonés	14,06
						Sesquiterpènes oxygénés	1,82
						Préconène I	76,46

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des tiges de *A. conyzoides* a montré une prédominance en préconène I avec une teneur de 76,46%. Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés sont respectivement présents à 14,06 et 1,82%. Parmi les monoterpènes, les hydrocarbonés sont à 3,90% et les oxygénés (2,10%) (Figure 19). Le préconène I 76,46%, le β -caryophyllène (8,06%) constituent les composés majoritaires.

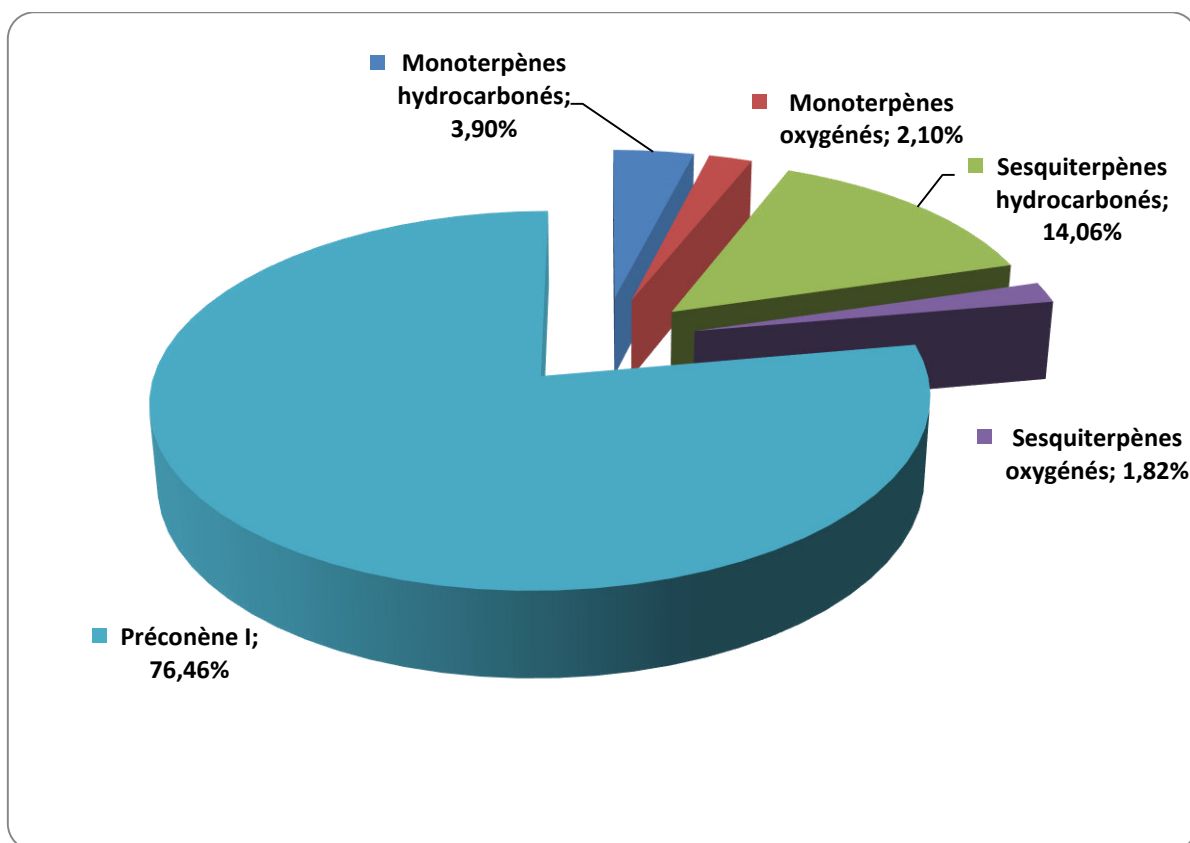


Figure 18: Répartition des familles de molécules des tiges de *Ageratum conyzoides*

1.2.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle des *Croton hirtus*

1.2.2.2.1 Feuilles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles de *Croton hirtus* a permis d'identifier 60 composés représentant 96,07% de l'huile totale (Tableau IV).

Tableau IV: Composition chimique des feuilles de *Croton hirtus*

N°	KI	Composés	%	N°	KI	Composés	%
1	902	Heptanal	0,02	33	1488	germacrène-D	22,57
2	934	α -pinène	0,02	34	1494	β -sélinène	0,44
3	973	Sabinène	0,01	35	1496	Valencène	0,93
4	989	myrcène +	0,04	36	1499	bicyclogermacrène	2,68
5	1025	para cymène	0,04	37	1503	α -muurolène	0,5
6	1030	Limonène	0,02	38	1512	germacrène-A	1,17
7	1033	1,8-cinéol	0,07	39	1516	γ -cadinène	0,15
8	1047	(E)- β -ocimène	0,02	40	1520	7-épi- α -sélinène	1,59
9	1059	γ -terpinène	0,05	41	1524	Δ -cadinène	0,32
10	1099	Linalol	0,03	42	1535	cadina-1,4-diène trans	0,06
11	1103	Hitriénol	0,12	43	1544	7-épi-cis-dracunculifoliol	0,13
12	1113	4,8-diméthyl-nona-1,3,7-triène E	0,1	44	1550	Elémol	0,1
13	1154	1-ethyl-4-methoxybenzène	0,03	45	1561	nérolidol E	0,44
14	1196	α -terpinéol	0,02	46	1564	germacrène-B	1,37
15	1200	Safranal	0,03	47	1572	germacrène-D-4-ol	0,06
16	1224	Nérol	0,01	48	1581	Spathulénol	1,02
17	1290	Thymol	0,36	49	1587	oxyde de caryophyllène	1,87
18	1352	α -cubébène	0,07	50	1614	humulène- époxyde II	0,36
19	1358	silphin-1-ène	0,42	51	1619	1,10-diépïcubénol	0,15
20	1364	acétate de néryle	0,02	52	1624	10-épi- γ -eudesmol	0,08
21	1372	Cyclosativène	0,34	53	1637	γ -eudesmol	0,18
22	1379	α -copaène	2,16	54	1641	caryophylla-4(14),8(15)-diène-5- β -ol	0,3
23	1387	β -bourbonène	3,09	55	1645	épi α -cadinol	0,45
24	1392	β -élémente	6,19	56	1659	α -cadinol	1,25
25	1428	(E)-caryophyllène	31,75	57	1687	eudesma-4(15),7-diène-1-béta-ol	0,27
26	1431	β -copaène	0,18	58	1839	6,10,14-triméthyl-penta-décan-2-one	0,07
27	1434	β -élémente	0,52	59	2106	Phytol	0,54
28	1448	Isogermacrène	0,52	60	2210	Phytolacétate	0,5
29	1458	brasila-1(6),5(10)-diène	0,46				
30	1461	α -humulène	7,42			TOTAL	96,07
31	1464	Précocène I	1,15			Monoterpènes hydrocarbonés	14,79
32	1479	β -muurolène	1,24			Monoterpènes oxygénés	0,76
						Sesquiterpènes hydrocarbonés	74,06
						Sesquiterpènes oxygénés	3,88
						Autres	2,58

L'huile essentielle des feuilles de *Croton hirtus* est constituée à 93,68% de dérivés terpéniques, correspondant à 77,94% de sesquiterpènes et 15,55% de monoterpènes. Parmi les monoterpènes, les hydrocarbonés constituent 14,79% tandis que les monoterpènes oxygénés ne représentent que 0,61% de l'huile totale. Parmi les sesquiterpènes, les hydrocarbonés représentent près de 87,31% contre 6,37% pour les composés oxygénés (Figure 20).

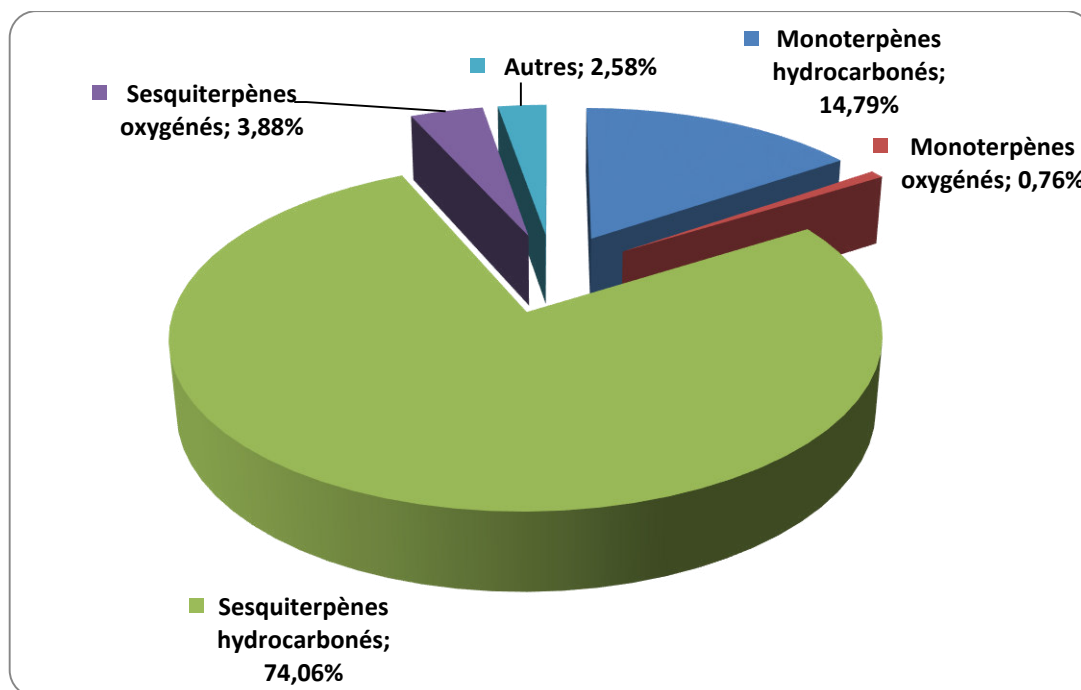


Figure 19: Répartition des familles de molécules présentes dans les feuilles de *C. hirtus*

Les structures chimiques de (E)-caryophyllène (31,75%), germacrène-D (22,57%) et α -humulène (7,42%) identifiés comme composés majoritaires, sont rapportés sur la figure 21. Les composés majoritaires représentent 61,74% de l'huile.

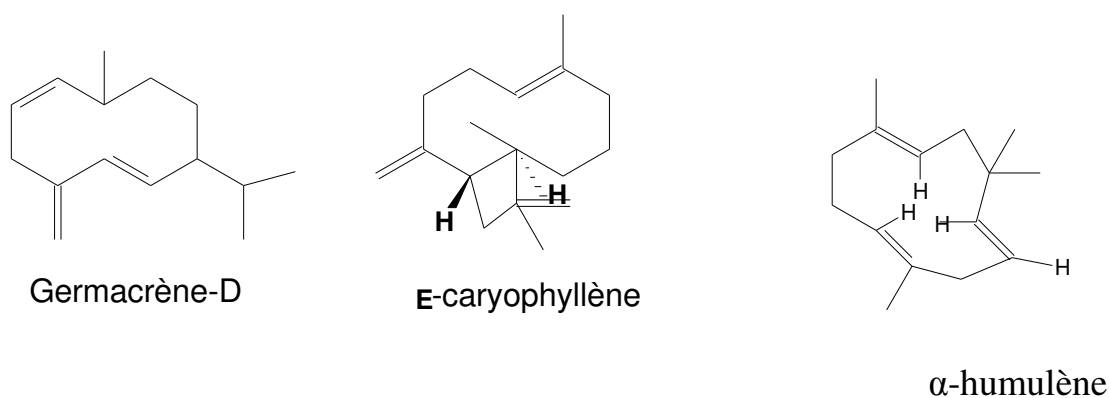


Figure 20 : Composés majoritaires issus des feuilles de l'huile essentielle de *Croton hirtus*

1.2.2.2.2 Tiges

L'analyse de l'huile essentielle des tiges de *C. hirtus*, a permis d'identifier 24 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0,01%. Ces composés représentent 92,17% de l'huile totale (Tableau V).

Tableau V: Composition chimique des tiges de *Croton hirtus*

N°	KI	Composés	%	N°	KI	Composés	%
1	902	Heptanal	Nd	33	1488	germacrène-D	4,03
2	934	α -pinène	Nd	34	1494	β -sélinène	0,44
3	973	Sabinène	Nd	35	1496	Valencène	1,37
4	989	myrcène +	Nd	36	1499	bicyclogermacrène	0,74
5	1025	para cymène	Nd	37	1503	α -muurolène	1,2
6	1030	Limonène	Nd	38	1512	germacrène-A	0,65
7	1033	1,8-cinéol	Nd	39	1516	γ -cadinène	Nd
8	1047	(E)- β -ocimène	Nd	40	1520	7-épi- α -sélinène	1,53
9	1059	γ -terpinène	Nd	41	1524	Δ -cadinène	0,54
10	1099	Linalol	Nd	42	1535	cadina-1,4-diène trans	Nd
11	1103	Hitriénol	Nd	43	1544	7-épi-cis-dracunculifoliol	0,47
12	1113	4,8-diméthyl-nona-1,3,7-triène E	Nd	44	1550	Elémol	0,34
13	1154	1-ethyl-4-methoxybenzène	Nd	45	1561	nérolidol E	Nd
14	1196	α -terpinéol	Nd	46	1564	germacrène-B	2,78
15	1200	Safranal	Nd	47	1572	germacrène-D-4-ol	Nd
16	1224	Nérol	Nd	48	1581	Spathuléol	0,86
17	1290	Thymol	0,26	49	1587	oxyde de caryophyllène	6,95
18	1352	α - cubébène	Nd	50	1614	humulène- époxyde II	1,72
19	1358	silphin-1-ène	0,37	51	1619	1,10-diépïcubénol	0,69
20	1364	acétate de néryle	Nd	52	1624	10-épi- γ -eudesmol	Nd
21	1372	Cyclosativène	0,43	53	1637	γ -eudesmol	1,08
22	1379	α -copaène	1,99	54	1641	caryophylla-4(14),8(15)-diène-5- β -ol	1,64
23	1387	β -bourbonène	2,17	55	1645	épi α -cadinol	0,11
24	1392	β -élémane	3,72	56	1659	α -cadinol	2,07
25	1428	(E)-caryophyllène	37,42	57	1687	eudesma-4(15),7-diène-1-béa-ol	0,27
26	1431	β -copaène	0,47	58	1839	6,10,14-triméthyl-penta décan-2-one	Nd
27	1434	β -élémane	0,43	59	2106	Phytol	0,4
28	1448	Isogermacrène	0,14	60	2210	Phytolacétate	1,37
29	1458	brasila-1(6),5(10)-diène	Nd			TOTAL	92,17
30	1461	α-humulène	9,64			Monoterpènes hydrocarbonés	00
31	1464	Précocène I	2,42			Monoterpènes oxygénés	0,26
32	1479	β -muurolène	1,6			Sesquiterpènes hydrocarbonés	73,94
						Sesquiterpènes oxygénés	14,48
						Autres	3,9

Parmi les composés terpéniques identifiés on note 88,42% de sesquiterpènes et 0,26% de monoterpènes. La fraction monoterpénique est constituée uniquement de monoterpènes oxygénés, les monoterpènes hydrocarbonés étant totalement absents (0%). Parmi les sesquiterpènes, les hydrocarbonés représentent la classe majoritaire avec un taux de 73,94% contre 14,48% pour les composés oxygénés (Figure 22).

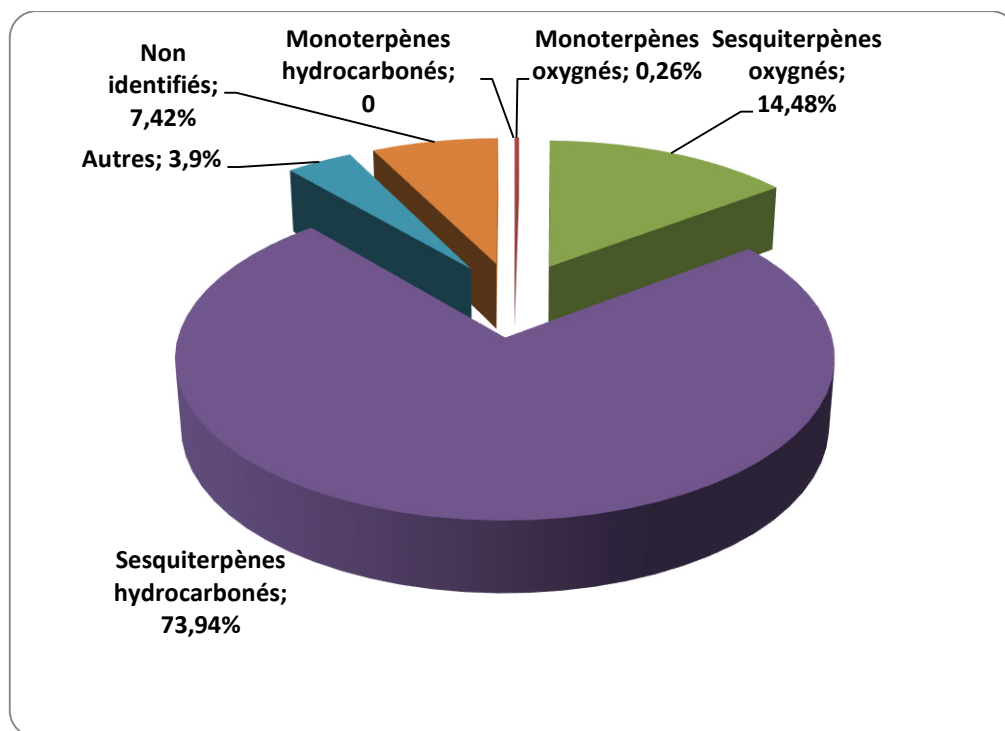


Figure 21: Répartition des familles de molécules présentes dans des tiges de *Croton hirtus*

(E)-caryophyllène (37,72%), α -humulène (9,64%) et l'oxyde de caryophyllène (6,95%) et ont été identifiés comme composés majoritaires (Figure 23).

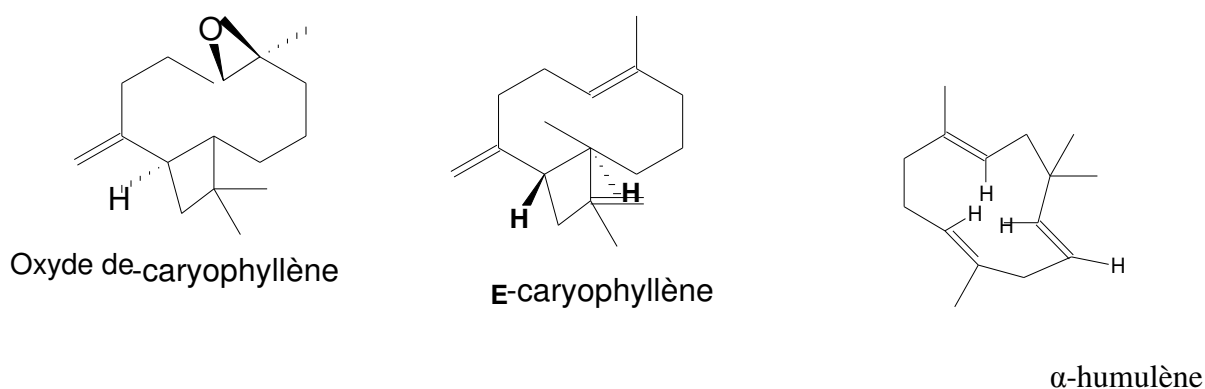


Figure 22: Structure chimiques de quelques composés majoritaires des tiges d'huile essentielle de *Croton hirtus*

1.2.2.3 Composition chimique de l'huile essentielle de *Cardiospermum grandiflorum*

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles issues des parties aériennes (feuilles + fleurs + tiges) fraîches de *C. grandiflorum* a permis d'identifier 44 composés représentant 96,05% de l'huile (Tableau VI).

Tableau VI : Composition chimique des parties aériennes (feuilles + fleurs + tiges) de *Cardiospermum grandiflorum*

N°	KI	Composés	%	N°	KI	Composés	%
1	990	Myrcene	0,19	24	1480	gamma humulene	0,6
2	1026	para cymene	0,71	25	1486	germacrène-D	11,97
3	1060	γ -terpinene	0,86	26	1488	alpha himachalene	14,86
4	1100	Linalol	0,13	27	1494	Bicyclogermacrene	0,96
5	1183	terpinene-4-ol	0,12	28	1500	bêta-himachalene	0,72
6	1277	decan-9-en-1-ol	Nd	29	1504	α -farnesene	1,76
7	1291	Thymol	7,47	30	1512	(Z)-gamma-bisabolene	0,53
8	1337	delta elemene	0,64	31	1520	delta cadinène	0,29
9	1354	α -longipinene	0,85	32	1545	α -calacorene	0,21
10	1372	α -ylangene	1,48	33	1551	Elemol	0,46
11	1379	α -copaene	0,36	34	1556	caryophyllene oxyde isomère	0,49
12	1387	β -bourbonene	1,25	35	1564	germacrène-B	3,98
13	1391	β -elemene	0,95	36	1570	β -calacorene	0,32
14	1408	iso caryophyllene	0,31	37	1582	Dendrolasin	0,25
15	1425	β-caryophyllene	17,09	38	1588	oxyde de caryophyllene	6,05
16	1431	β -copaene	0,6	39	1615	humulene oxyde II	0,52
17	1434	gamma elemene	0,29	40	1628	10-epi-gamma-eudesmol	0,58
18	1444	guaïa-6,9-diene	0,23	41	1715	Mayurone	0,32
19	1448	geranyl acetone	0,42	42	1769	Benzoate de benzyle	0,21
20	1454	(E)-beta farnesene	11,35	43	1840	6,10,14-trimethyl-pentadecan-2-one	0,41
21	1460	α -humulene	2,08	44	2107	Phytol	1,83
22	1464	6-demethoxy-ageratochromene	0,97				
23	1473	9-épi-(E)-caryophyllene	0,38				
						TOTAL	96,05
						Monoterpènes hydrocarbonés	1,76
						Monoterpènes oxygénés	7,72
						Sesquiterpènes hydrocarbonés	75,7
						Sesquiterpènes oxygénés	10,87

Celle-ci se compose entièrement de dérivés terpéniques. 07 hydrocarbures monoterpéniques, représentent 9,48% de l'huile, ont été identifiés dont le plus important est le thymol (7,09%). Parmi les sesquiterpènes, les hydrocarbonés représentent 75,7% tandis que les oxygénés représentent 10,87% de l'huile totale (Figure 24).

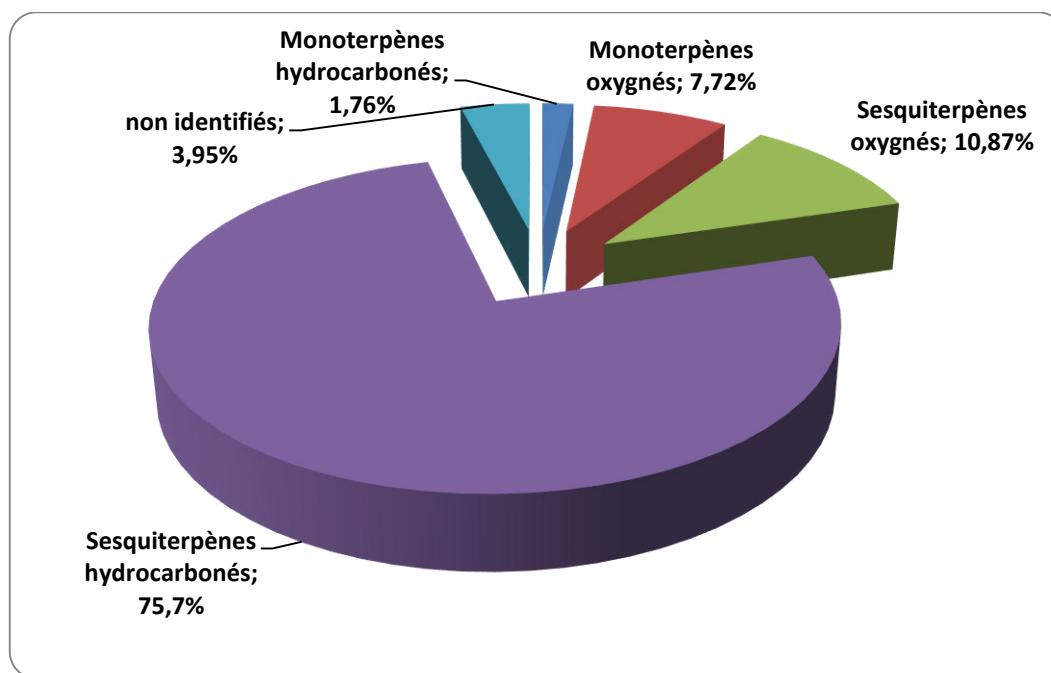


Figure 23: Répartition des familles de molécules présentes dans les feuilles, tiges et fleurs de *Cardiospermum grandiflorum*

Quatre sesquiterpènes que sont β -caryophyllène (17,09%), (E)- β -farnesene (11,35%), germacrène-D (11,97%) et α -himachalène (14,86%) ont été identifiés comme composés majoritaires (Figure 25). Ces composés majoritaires représentent à eux seuls 55,27% de l'huile totale.

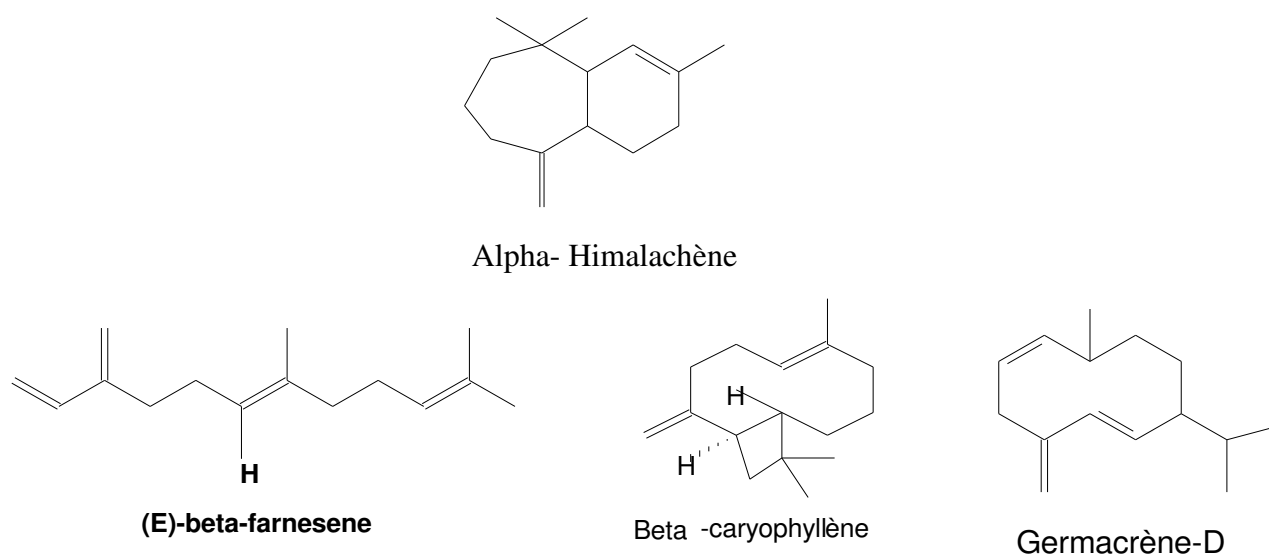


Figure 24: Structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de *Cardiospermum grandiflorum*

1.2.3. Fractionnement des huiles essentielles de *Chromoleana odorata*

Le fractionnement chromatographique de 10 g d'huile essentielle de *Chromoleana odorata* a permis de récupérer quatre fractions de masse allant de 6,89 g à 65 mg. La première fraction C₁ est de masse de 6,89 g est éluée avec 100% hexane soit un rendement de 68,9%, la fraction C₂ 85 mg éluée avec le mélange Hexane/Acétate d'éthyle 95/5 soit un rendement de 0,85%, la fraction C₃ 70 mg éluée avec le mélange Hexane/Acétate d'éthyle 5/95 soit un rendement de 0,7% et la fraction C₄ 65 mg éluée avec le mélange Hexane/Acétate d'éthyle 0/100 soit un rendement de 0,65%. La chromatographie sur colonne fine a donc permis de récupérer 7,11 g soit un taux de récupération de 71,1% (Figure 26).

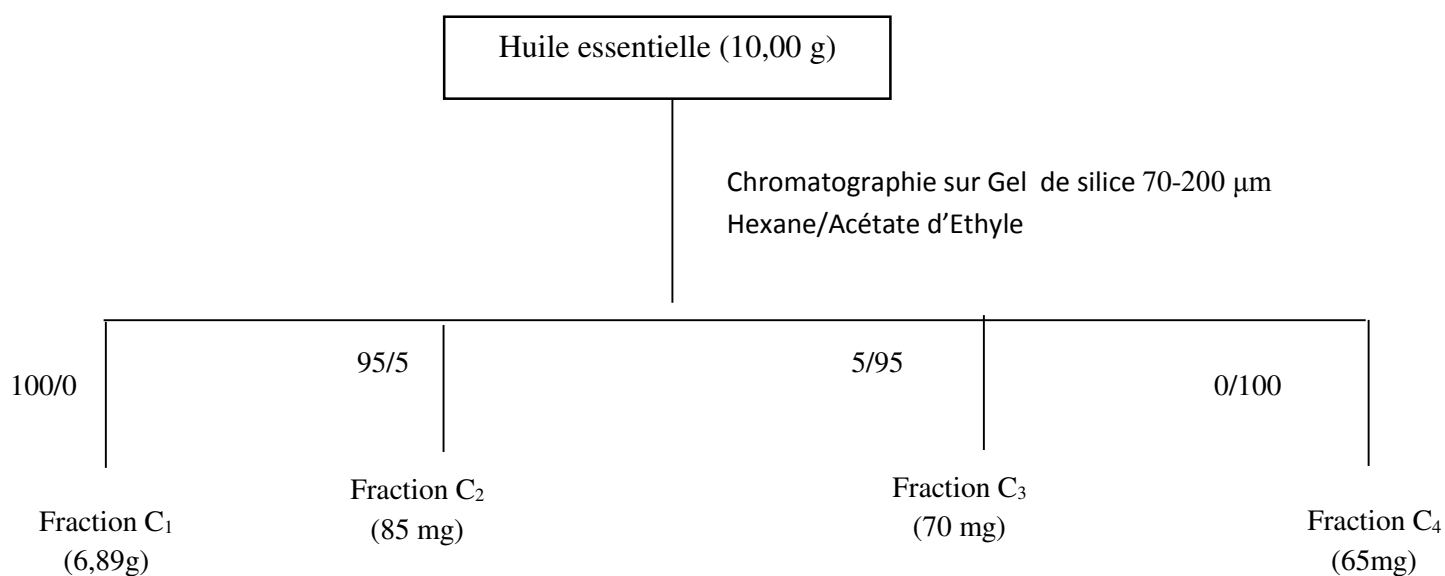


Figure 25: Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Chromoleana odorata*

1.3 Tests biologiques

1.3.1 Activité antibactérienne

1.3.1.1 Activité antibactérienne par la méthode de diffusion

1.3.1.1.1 Sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion de disque. La classification des souches bactériennes en catégories « sensibles, (S) », « Intermédiaire, (I) » ou « Résistant, (R) » aux antibiotiques est définie par le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013). Ce qui a permis de définir les différents phénotypes des souches bactériennes étudiées (Tableau VII).

Tableau VII : Phénotypes des souches bactériennes étudiées

Souches bactériennes	Numéro	Phénotype
<i>Enterococcus faecalis</i>	469C/13	MLSB
<i>Salmonella enterica</i>	548C/13	Résistance croisée a toutes quinolones (FQEB02)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	444C/13	Résistance croisée aux fluoroquinolones (RCFQ) BLSE
<i>Shigella sp</i>	745C/13	Résistance croisée aux fluoroquinolones (RCFQ)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1289C/13	Résistance à la fosmycine
<i>Staphylococcus aureus</i>	524C/13	Sauvage
<i>Shigella sp</i>	434C/13	Sauvage
<i>Staphylococcus aureus</i>	408C/13	Pénicillinase
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Phénotype sauvage
<i>Citrobacter koseri</i>	745C/13	Résistance croisée aux fluoroquinolones (RCFQ)
<i>Enterobacter cloacea</i>	409C/13	sauvage (quinolone)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sauvage
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sauvage
<i>Enterobacter aerogenes</i>	746C/13	sauvage (quinolone)

1.3.1.1.2 Sensibilité aux huiles essentielles : test d'inhibition

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques a été évaluée sur 14 souches bactériennes par la méthode de diffusion de disque. Le DMSO utilisé pour la solubilité des huiles essentielles est sans effet sur la croissance des bactéries. La gentamicine (15µg) est utilisée comme témoin positif. Les résultats des diamètres d'inhibition obtenus varient de 6,67 à 17,66 mm (Tableau VIII).

Tableau VIII : Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles de *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus* et *Chromolaena odorata*.

Souches bactériennes	Numéro	<i>A. conyzoides</i>		<i>C. Hirtus</i>		<i>C. odorata</i>	GM 15
		Fleurs	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	
Bacterie à Gram positif							
<i>Enterococcus feacalis</i>	469C/13	8,33±1,41	8,00±1,41	7,71±0,71	7,33±0,00	17,66±0,58	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	524C/13	9,67±0,00	9,00±0,00	8,00±1,41	7,67±0,71	13,33±0,58	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	408C/13	10,33±0,71	10,00±0,00	-	-	11,67±0,71	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	12,67±0,00	12,00±0.71	10,0±1,00	7,33±0,00	13,66±0,58	27
Bacterie à Gram négatif							
<i>Salmonella enterica</i>	548C/13	7,33±0,71	7,67±0,71	-	-	13,00±1,41	21
<i>Klebsiella pneumonia</i>	444C/13	7,00±0,00	6,67±0,00	-	-	10,66±0,58	6
<i>Shigella sp</i>	745C/13	7,71±0,71	7,00±0,00	-	-	12,00±1,41	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1289	-	-	-	-	-	21
<i>Shigella sp</i>	434C/13	7,67±0,71	7,67±0,00	-	-	11,67±1,15	21
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	7,67±0,71	7,33±0,71	-	-	12,67±1,15	19
<i>Citrobacter koseri</i>	745C/13	7,33±0,71	7,33±0,00	-	-	10,66±0,58	23
<i>Enterobacter cloacea</i>	409C/13	7,00±0,00	7,00±0,00	-	-	10,33±0,58	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	-	-	-	-	22
<i>Enterobacter aerogenes</i>	746C/13	6,67±0,00	7,33±0,71	-	-	08,33±0,58	6

GEN : Gentamycine (15μ) , - :absence de zone d'inhibition

De manière générale, l'action des fleurs et des tiges d'*A. conyzoides* sur l'ensemble des souches bactériennes testées a permis d'avoir des diamètres des zones d'inhibition allant respectivement de 7,33 à 12,67 mm et de 6,67 à 12,00 mm. Quant aux feuilles et des tiges de *C. hirtus*, elles ont permis d'avoir des diamètres des zones d'inhibition sur uniquement sur les souches de *E. feacalis* 469C/13 (7,71 et 7,33 mm), *S. aureus* 524C/13 (8,00 mm et 7,67 mm) et *S. aureus* ATCC 25923 de 10,00 à 7,33 mm. Avec *C. odorata*, les diamètres des zones d'inhibition varient généralement de 08,33 à 17,66 mm. La souche de *E. feacalis* a présenté une plus grande sensibilité avec un diamètre 17,66 mm suivi de *S. enterica* avec un diamètre de 13,00 mm. Toutes les huiles testées n'ont montré aucune activité sur les souches de *P. aeruginosa*. Tous les diamètres obtenus par la gentamicine sur l'ensemble des souches varient de 6 à 32 mm.

Les diamètres générés par les huiles essentielles, sont nettement inférieurs à ceux produits par la gentamicine et très variable selon l'huile utilisée. L'activité des huiles essentielles qui sont des mélanges complexes de plusieurs molécules, sont généralement inférieures à celle exercée par les antibiotiques. Aussi selon la classification de **Duraffourd et al., (1990)**, l'huile essentielle est considérée comme inactive si elle produit des diamètres d'inhibition inférieurs ou égaux à 8 mm, intermédiaire pour des diamètres compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyennement efficace pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm l'huile est très efficace.

L'huile essentielle de *C. odorata* exerce une bonne activité sur les des bactéries Gram positif (10,33-17,66 mm) et une activité moyenne sur les bactéries Gram négatif. Les huiles essentielles de *C. hirtus* et *A. grandiflorum* sont inactives sur les bactéries Gram négatif et présentant une faible activité sur les bactéries à Gram Positif.

2.3.1.1 Concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactéricide

Dans ce tableau ci-dessous sont consignés les résultats des CMI ($\mu\text{g/mL}$) des huiles essentielles des différentes plantes étudiées (Tableau IX).

Tableau IX: Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus* et *Chromoleana odorata*

Souches bactériennes	Numéro	<i>A. conyzoides</i>		<i>C. Hirtus</i>		<i>C. odorata</i>	GM 15
		Fleurs	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	
Gram positif							
<i>Enterococcus feacalis</i>	469C/13	256	256	256	256	128	128
<i>Staphylococcus aureus</i>	524C/13	256	256	512	512	64	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	408C/13	128	128	512	512	128	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	64	64	512	512	128	27
Gram négatif							
<i>Salmonella enterica</i>	548C/13	128	128	> 512	> 512	256	1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	444C/13	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	128
<i>Shigella sp</i>	745C/13	512	512	> 512	> 512	> 512	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1289	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	0,5
<i>Shigella sp</i>	434C/13	512	512	> 512	> 512	256	1
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	256	256	> 512	> 512	256	0,1
<i>Citrobacter koseri</i>	745C/13	256	256	> 512	> 512	> 512	0,5
<i>Enterobacter cloacea</i>	409C/13	128	128	> 512	> 512	256	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	746C/13	512	512	> 512	> 512	> 512	128

De façon générale, nous constatons que les CMI de l'huile essentielle d'*A. conyzoides* fleurs et tiges varient de 128 à 512 µg/mL, voir même au-delà de 512 µg/mL. Ces deux observations sont faites pour les feuilles et les tiges de *C. hirtus*. Quant aux feuilles de *C. odorata*, nous constatons que la CMI varie 64 et au-delà de 512 µg/mL. Ces faits sont vérifiés quelque soit la souche bactérienne testée.

A la lecture des résultats obtenus on remarque que l'huile essentielle de *C. odorata* a présenté une bonne activité sur l'ensemble des souches testées. Quant aux autres huiles essentielles, leurs activités restent faibles. On note également une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

Quant aux CMB des huiles, elles sont rapportées dans le tableau X. Les valeurs des CMB obtenues sont au-dessus de 512 µg/mL ou non déterminées et cela quelque soit la souche bactérienne et l'organe utilisée.

Tableau X: Concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles de *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus* et *Chromoleana odorata*.

Souches bactériennes	Numéro	<i>A. conyzoides</i>		<i>C. Hirtus</i>		<i>C. odorata</i>
		Fleurs	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles
Gram Positif						
<i>Enterococcus feacalis</i>	469C/13	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	408C/13	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	512	512	> 512	> 512	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	524C/13	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
Gram négatif						
<i>Salmonella enterica</i>	548C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	> 512
<i>Klebsiella pneumonia</i>	444C/13	nd	Nd	Nd	Nd	nd
<i>Shigella sp</i>	745C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1289	nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Shigella sp</i>	434C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	> 512
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	> 512	> 512	Nd	Nd	> 512
<i>Citrobacter koseri</i>	745C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	nd
<i>Enterobacter cloacea</i>	409C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	> 512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	nd	Nd	Nd	Nd	nd
<i>Enterobacter aerogenes</i>	746C/13	> 512	> 512	Nd	Nd	nd

nd :Non déterminé

1.3.2 Activité antibactérienne des fractions d'huile essentielle de *Chromoleana odorata*

La CMI de l'huile essentielle de *Chromoleana odorata* et de ses différentes fractions a été déterminée par la technique de microdilution. L'huile essentielle brute présente une CMI allant 128 à 256 µg/mL pour les souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Pour les autres souches, toutes les CMI sont supérieures à 512 µg/mL (Tableau XI).

Tableau XI : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *Chromoleana odorata* et de ses fractions

Souches bactériennes		CMI (µg/mL)				HE
		Fractions				
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
Gram Positif						
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	256	16	16	16	128
<i>Staphylococcus coagulase -</i>	ASSURMI 743C/13	256	16	16	32	128
<i>Staphylococcus aureus</i>	ASSURMI 524C/12	>512	>512	16	16	128
Gram négatif						
<i>Escherichia coli</i>	ASSURMI 748C/13	>512	>512	256	128	256
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	>512	>512	256	128	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ASSURMI 444C/13	>512	>512	256	128	>512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	>512	>512	256	128	>512
<i>Shiguella sp</i>	ASSURMI 434C/13	>512	>512	256	128	>512
<i>Citrobacter koseri</i>	ASSURMI 745C/13	>512	>512	256	128	>512
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ASSURMI 746C/13	>512	>512	256	128	>512

La fraction C₁ est active uniquement sur deux souches de *S. aureus* avec une CMI de 256 µg/mL alors qu'elle présente une CMI supérieure 512 µg/mL sur l'ensemble des autres souches. La fraction C₂ est active uniquement sur deux souches de *S. aureus* avec une CMI de 16 µg/mL alors qu'elle présente une CMI supérieure 512 µg/mL sur l'ensemble des autres souches. La fraction C₃ est active sur l'ensemble des souches avec des CMI allant de 16 à 512 µg/mL. Les CMI les plus basses ont été obtenues sur les souches de *S. aureus*. La fraction C₄ est active sur l'ensemble des souches avec des CMI allant de 16 à 128 µg/mL.

Les valeurs des CMB de l'huile essentielle de *C. odorata* et de ses fractions sont rapportées dans le tableau XII. Seules les fractions C₂ et C₃ ont montré une activité bactéricide sur les souches de *S. aureus*.

Tableau XII : CMB des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de ses fractions

Souches bactériennes		CMB (µg/mL)				HE
		Fractions				
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
Gram Positif						
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Nd	128	128	256	>512
<i>Staphylococcus coagulase -</i>	ASSURMI 743C/13	Nd	128	128	256	>512
<i>Staphylococcus aureus</i>	ASSURMI 524C/12	Nd	nd	128	256	>512
Gram négatif						
<i>Escherichia coli</i>	ASSURMI 748C/13	Nd	nd	>512	>512	>512
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Nd	nd	>512	>512	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ASSURMI 444C/13	Nd	nd	>512	>512	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Nd	nd	>512	>512	nd
<i>Shiguella sp</i>	ASSURMI 434C/13	Nd	nd	>512	>512	nd
<i>Citrobacter koseri</i>	ASSURMI 745C/13	Nd	nd	>512	>512	nd
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ASSURMI 746C/13	Nd	nd	>512	>512	nd

1.3.3 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Croton hirtus* combinée avec des antibiotiques (ceftazidime et gentamicine)

1.3.3.1 Diamètre d'inhibition

Les résultats des diamètres d'inhibition sont rapportés dans le tableau XIII. L'huile essentielle est active uniquement sur la souche de *S. aureus* avec un diamètre de 10 mm. La gentamicine et la Cefotaxime ont donné des diamètres respectifs de 28,7 mm et 19,7 mm sur la souche de *S. aureus* ATCC 25923 et 22,3 mm et 22,3 mm pour la souche *E. coli* ATCC 25922. L'association de l'huile essentielle de *C. hirtus* avec les deux antibiotiques n'a aucun effet sur les diamètres d'inhibition des souches de *E. coli* ATCC 25922. Par contre elle permet une potentialisation du diamètre d'inhibition de gentamicine et la Cefotaxime respectivement de 24,39% et 23,35% sur la souche de *S. aureus* ATCC 25923.

Tableau XIII : Diamètres d'inhibition de l'association de l'huile essentielle de *Croton hirtus* avec la gentamicine et la ceftazidime

Bactéries	Diamètre d'inhibition (moyenne± écart type)						
	A	B		C		Elévation	
		GM 15	CAZ 10	GM 15	CAZ 10	GM 15	CAZ 10
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.0±1,0	28,7±0,6	19,7±0,6	35,7±1,2	24,3±0,6	(↑24.39%)	(↑23,35%)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	22,3±0,6	22,3±0,6	22,3±1,2	22,7±0,6	(00%)	(00%)
A: Diamètre inhibition huile essentielle de <i>C. hirtus</i> (20µl/disc)							
B: Diamètre inhibition de la Gentamicine (GM15) and ceftazidime (CAZ10)							
C: Diamètre inhibition association huile essentielle et antibiotiques classiques, Gentamicine (GM15) et ceftazidime (CAZ10)							

1.3.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La CMI de la combinaison de l'huile essentielle de *Croton hirtus* avec la gentamicine et la ceftazidime été déterminée par la technique de microdilution. La CMI de l'huile essentielle testée seul sur la souche de *E. coli* est supérieure à 512 mg/mL, sur la souche de *S. aureus* elle est de 512 mg/mL. Sur la souche de *E. coli*, l'huile essentielle à la concentration de 64 µg/ml n'a aucun effet sur la CMI de la gentamicine et la ceftazidime. Sur la souche de *S. aureus*, l'huile essentielle à la concentration de 64 µg/mL fait passer la CMI de la gentamicine de 64 à 16 µg/ml et la ceftazidime 16 à 8 µg/mL (Tableau XIV).

Tableau XIV : Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) pour les combinaisons d'huile essentielle de *C. odorata* et les antibiotiques

Antibiotique	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	CMI seul	CMI combinée HE <i>C. hirtus</i> 64 $\mu\text{g/mL}$	CMI seul	CMI combinée HE <i>C. hirtus</i> 64 $\mu\text{g/mL}$
HE	> 512	nd	512	Nd
Gentamicine	32	32	64	16
Ceftazidime	0,5	0,5	16	8

1.3.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *A. conyzoides*, *C. hirtus* et *C. grandiflorum* a été évaluée par les méthodes de DPPH et de FRAP.

Par la méthode de DPPH et de FRAP, la CI_{50} de l'huile essentielle de fleurs *A. conyzoides* est respectivement de 3020 $\mu\text{g/mL}$ et 2010 $\mu\text{g/mL}$. Pour les tiges de la même plante, elle est de 1970 et 890 $\mu\text{g/mL}$. Pour les feuilles *C. hirtus*, elle est de 950 et 650 $\mu\text{g/mL}$. La CI_{50} des tiges *C. hirtus* par la méthode DPPH est de 720 $\mu\text{g/mL}$ contre 350 $\mu\text{g/mL}$ par la méthode de FRAP. Pour *C. odorata* la CI_{50} est de 1050 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) et 620 $\mu\text{g/mL}$ (FRAP). Pour *C. grandiflorum* elle est de 0,95 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) et 0,67 $\mu\text{g/mL}$ (FRAP). Pour la vitamine C la CI_{50} est de 1,53 $\mu\text{g/mL}$ (Tableau XV).

Tableau XV : Résultats de l'activité antioxydante l'huile essentielle de *A. conyzoides*, *C. hirtus*, *C. grandiflorum* et *C. odorata*

Espèce végétal	Parties utilisées	CI ₅₀ (µg/mL)	
		Test DPPH	Test FRAP
<i>A. conyzoides</i>	Fleurs	3020	2010
	Tiges	1970	890
<i>C. hirtus</i>	Feuilles	950	650
	Tiges	720	350
<i>C. grandiflorum</i>	Feuilles	0,95	0,67
<i>C. odorata</i>	Feuilles	1050	620
Vitamine C		1,53	0,90

D'après la méthode DPPH, l'ordre de la tendance des huiles essentielles est donc le suivant : *C. grandiflorum* (0,95 µg/mL) > tiges *C. hirtus* (720 µg/mL) > feuilles de *C. hirtus* (950 µg/mL) > *C. odorata* (1050 µg/mL) > tiges de *A. conyzoides* (1970 µg/mL) > fleurs de *A. conyzoides* (3020 µg/mL).

Tant disque D'après le test de FRAP la classification des huiles essentielle selon leur activité antioxydante est énoncé suit : *C. grandiflorum* (0,67 µg/mL) > tiges *C. hirtus* (350 µg/mL) > feuilles de *C. hirtus* (650 µg/mL) > *C. odorata* (620 µg/mL) > tiges de *A. conyzoides* (1970 µg/mL) > fleurs de *A. conyzoides* (3020 µg/mL). (Figure 27).

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirment le potentiel antioxydant des huiles essentielles étudiées. En effet, les tests montrent que les huiles possèdent une bonne affinité avec les ions Fe³⁺. Les huiles essentielles des plantes étudiées ont montré une faible activité antioxydante par comparaison à la vitamine C (1,53 µg/mL). Seule l'huile essentielle de *C. grandiflorum* affiche la plus grande activité antioxydante.

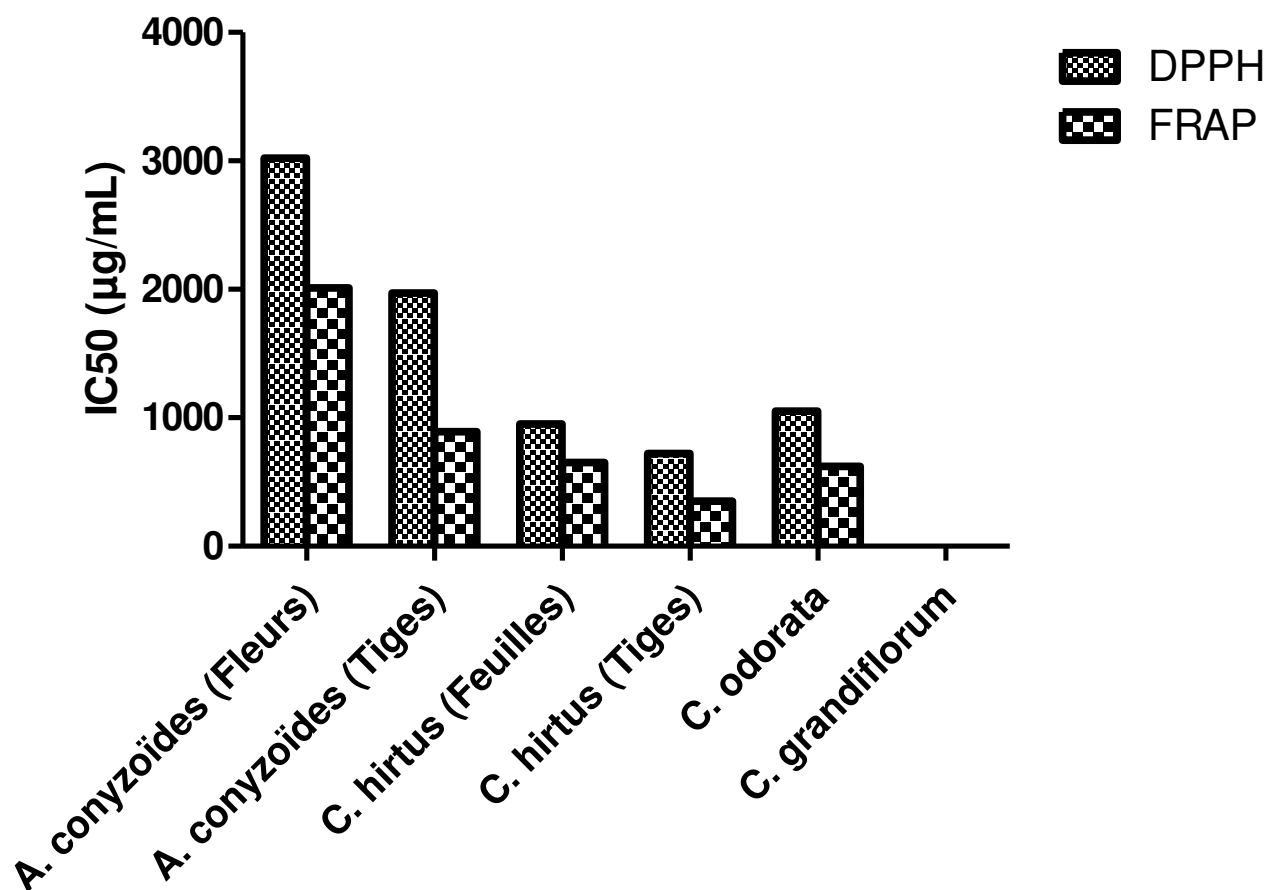


Figure 26: Résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus*, *Chromolaena odorata* et *Cardiospermum grandiflorum*

2. Discussion

2.1 Etude chimique

2.1.1 Rendements

Les huiles essentielles de plantes récoltées en décembre 2012 dans le Centre Ouest de la Côte d'Ivoire ont été extraites par la technique d'hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger. Les Asteracea tout comme les Euphorbiaceae sont connus pour contenir des huiles essentielles (**Kouamé, 2012**). L'ensemble de plantes étudiées a donné des rendements allant de 0,08 à 0,60%. En comparant séparément les rendements des huiles essentielles obtenus au cours de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature, nous avons fait les constats suivants. Pour les fleurs et les tiges de *A. conyzoides* (0,19 et 0,22%), nos résultats sont du même ordre de grandeur que les études rapportées par **Wandji et al., (1996)** et par **Sood, (1973)**. Ces auteurs ont montré que la teneur en huile essentielle d'*A. conyzoides* varie de 0,11 à 0,58% pour les feuilles, de 0,2% pour les fleurs fraîches et de 0,03 à 0,18% pour les racines. Des rendements similaires ont également été obtenus par **Aalbersger et al., (1991)** et **Usman et al., (2013)** sur les fleurs de la même plante acclimatée respectivement dans les Îles Fiji et au Nigeria. Pour l'huile essentielle issue des feuilles de *C. hirtus*, nos résultats sont différents de ceux rapportés par **De Lima et al., (2012)**. Ceux-ci ont trouvé des rendements allant de 0,3% à 0,4% sur les feuilles de la même espèce dans deux localités au Brésil. D'autres espèces du genre *Croton* sont connues pour leurs rendements très faibles en huile essentielle. C'est le cas de *C. adenocalyx* Baill dont le rendement en huile essentielle des feuilles fraîches varie de 0,12 à 0,14% (**Sidney et al., 2010**). *C. antanosiensis* (0,25%); *C. decaryi* Leandri (tiges: 0,19% et feuilles: 0,29%); *C. geayi* Leandri (0,32%); *C. sakamaliensis* (Tiges: 0,15% et feuilles: 0,38%). Les rendements en huiles essentielles de *C. grandiflorum* n'ont pas été décrits, à notre connaissance, à ce jour dans la littérature. Cependant le genre *Cardiospermum* est connu sa faible teneur en huile essentielle. Par exemple l'étude phytochimique de *Cardiospermum halicacabum* une autre espèce du genre *Cardiospermum*, a montré que cette plante ne possède pas d'huile essentielle (**Vinoth et al. 2013**). Ce confirme de façon générale nos résultats.

Les différences de rendement en huiles essentielles d'un organe à un autre ou d'une espèce à une autre ont été rapportées. Selon plusieurs auteurs, l'origine de récolte de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (**Russo et al., 1998 ; Tonzibo, 1998 ; Vekiari et al. 2002, , Karousou et al., 2005 ; Kouamé, 2012**).

2.2.2 Composition chimique

Pour l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des trois plantes, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse a été utilisée. La composition chimique des huiles des fleurs de *A. conyzoides* a montré une prédominance en précocène I (58,78%). La fraction sesquiterpénique est dominée par le β -caryophyllène (15,20%) et le germacrène-D (2,84%). Les tiges sont également dominées soit par le précocène I (76,46%). La fraction sesquiterpénique est dominée par le β -caryophyllène (8,06%). A part les différences quantitatives entre les fleurs et les tiges, on constate que la composition chimique des fleurs et des tiges de *A. conyzoides* est la même. Le chemotype est de type Précocène I.

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux obtenus au Nigéria et aux îles Fiji à partir des huiles essentielles des fleurs d'*A. Conyzoides*. En effet, l'espèce originaire du Nigeria contient 57,2% et celle des îles Fiji 16-60% précocène I. De plus, les huiles essentielles des fleurs d'*A. Conyzoides*, originaire du Nigeria contiennent majoritairement β -caryophyllène (19,5%) et du germacrène D (3,9%). Nos travaux semblent être en accord avec ceux de **Aalbersger et al., (1991)**. Ils sont issus de l'étude des fleurs en provenance des îles Fiji et caractérisés par une prédominance précocène I des sesquiterpènes et des chromènes avec comme composés majoritaires l'agératochromène (0,1-35%) et le précocène I (16-60%) (**Aalbersger et al., 1991**). Les travaux de **Usman et al.,(2013)** au Nigeria ont également montré que cette huile est constituée majoritairement de précocène I (57,2%) suivi du β -caryophyllène (19,5%). Cependant divers travaux sur la composition chimique des huiles essentielles des feuilles d'*A. Conyzoides* acclimaté au Viêt Nam, dans les îles Fiji ont montré que ces huiles essentielles contiennent principalement du l'agératochromène (précocène II) et/ou dérivés. Selon plusieurs études, l'espèce acclimatée dans la zone occidentale Africaine se caractérise par une forte teneur en précocène I. C'est le cas du Congo (87%), du Burkina Faso (86% de précocène I), du Ghana (80,29%), du Nigeria (82,20%), du Bénin (85,6%), de Côte-d'Ivoire (80%), et du Cameroun (81%) (**Nébié et al., 2004**). Celle rencontrée dans la zone asiatique tel que le Vietnam, le Pakistan ou encore Inde possède des huiles essentielles qui contiennent en proportions appréciables du précocène I et II. Par contre, au Vietnam ou encore les îles Fiji, les huiles essentielles sont riches en précocène II et le 6-méthoxyagératochromène. Nos travaux comme ceux de **Usman et al., (2013)** au Nigeria ont permis de mettre en évidence un taux similaire de β -caryophyllène (19,5%) dans les fleurs. Ce composé est également présent dans les huiles essentielles issues des feuilles de cette plante il est de 8,13% au Burkina Faso, 6,0% en Côte d'Ivoire et de 20% dans la région du Hymalayan. Du point de vue quantitatif la composition chimique des fleurs, des tiges et de feuilles d'*A. Conyzoides* originaire de la zone occidentale Africaine est un chemotype à précocène I. Les résultats similaires avaient été obtenus à partir des

feuilles, tiges et racines de cette même plante présente dans le nord du Brésil. Les auteurs avaient montré que la composition chimique des feuilles, des tiges et des racines étaient identiques (**Glauciemar et al., 2008**).

En comparant la composition chimique des fleurs et des tiges d'*Ageratum conyzoides* provenant du Centre Ouest de la Côte d'Ivoire, on retient qu'elles contiennent principalement le précocène I, avec une teneur plus élevée dans les tiges (76,46%) que dans les fleurs (58,78%). Les huiles essentielles des fleurs et des tiges sont dominées par les sesquiterpènes avec des taux quasiment similaires 89,44% pour les fleurs et 90,52% pour les tiges. Le chemotype obtenu des tiges et des fleurs d'*A. Conyzoides* est de type chromène. Le précocène I est le seul chromène présent dans les huiles essentielles des fleurs et des tiges d'*A. Conyzoides*. Cependant le β -caryophyllène est plus abondant dans les fleurs (15,2%) que dans les tiges (8,6%). Tandis que le germacrène D présent dans les fleurs est quasiment absent dans les tiges. Le précocène II (Agératochromène) étant à très faible quantité (0,12 et 0,06% respectivement).

Dans les huiles essentielles des feuilles et des tiges de *C. hirtus*, notre étude a montré une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés allant de 74,08% à 87,31% et de sesquiterpènes oxygénés allant de 0,26% à 6,37%. **De Lima et al.** en 2012 ont analysé la composition chimique des huiles essentielle de *C. hirtus* dans deux localités du Brésil. Ces auteurs ont montré une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés (38,6 à 95,1%) et des sesquiterpènes oxygénés (3,0 à 5,1%).

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *C. hirtus* a permis d'identifier le chemotype à caryophyllène, germacrène-D et α -humulène. Quant aux tiges elles ont permis de mettre en évidence un chemotype à (E)-caryophyllène, α -humulène et l'oxyde de caryophyllène. Les résultats de notre étude sont différents de ceux de **De Lima et al. (2012)** qui ont décrit le E-caryophyllène, germacrène-D, α -cadinène et α -humulène composés majoritaires au Brésil. Cependant on peut noter que α -cadinène absent dans notre huile a été détecté jusqu'à 1,8 et 13,5% par ces mêmes auteurs.

Initialement, les études menées par **Bracho & Crowley (1966)** avaient suggéré que la co-occurrence de α/β -pinène serait caractéristique du genre *Croton*. Cependant, les résultats de l'étude la composition chimique des huiles essentielles de certaines espèces du genre *Croton* ont montré que le β -caryophyllène et le linalol apparaissaient fréquemment comme constituants majoritaires dans les huiles essentielles de nombreuses espèces du genre *Croton*. Récemment, **Radulovic et al. (2006)** ont étudié la composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Croton* (*C. antanosiensis*, *C. decaryi*, *C. geayi*, *C. sakamaliensis*) originaire de Madagascar. Les résultats de cette étude ont plutôt montré la prédominance de β -caryophyllène et/ou α/β -pinène.

La différence de composition constatée entre les huiles essentielles de plantes étudiées et celles rapportées par d'autres auteurs est vraisemblablement liée à la régulation différentielle des divers constituants de l'huile essentielle des facteurs abiotiques et biotiques. De nombreux facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative, l'insolation et la nature du sol peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (**Boira et Blanquer, 1998 Oliveira et al., 2005**). Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles en fonction de la période de récolte, du site de récolte ou encore du cycle végétal sont nombreuses (**Tonzibo, 1998 ; Oussou, 2009 ; Kouamé, 2012**). La période de récolte est un facteur très important. A titre d'exemple, **Oussou** en 2008 a montré que la composition chimique l'huile essentielle des fleurs de *Lippia multiflora* varie considérablement. La teneur en géraniol et en néral passe respectivement de 37,8% et 25,7% du mois de décembre à 1,1% et 0,8% du mois d'octobre. L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal.

2.2.3 Fractionnement des huiles essentielles de *Chromoleana odorata*

Le protocole d'élution mis en œuvre dans cette étude, a permis de répartir les différentes familles et classes chimiques de *C. odorata*, dans les fractions respectives. L'analyse de la composition chimique des fractions est en cours d'analyse. L'huile essentielle de *C. odorata* utilisée dans cette étude est à chemotype germacrène-D, géijérène, prégeijérène β -caryophyllène et le monoterpène α -pinène (**Kouamé, 2012**). Cependant compte de la polarité croissante des solvants d'élution, la fraction C₁, pourrait être dominée par les hydrocarbures qui constituent les composés majoritaires de cette huile à savoir le germacrène-D, le géijérène, le prégeijérène ou encore le β -caryophyllène. La fraction C₂ serait dominée par la présence d'alcools terpéniques ainsi que les composés carbonylés. La fraction C₃ regroupe les molécules moyennement polaires, que sont les composés carbonylés, alors que la fraction C₄ concentre les molécules les plus polaires, tels que les alcools terpéniques que sont le Viridiflorol, α -cadinol ou l'elemol.

Le protocole de fractionnement de l'huile essentielle de *C. odorata* élaboré au cours de notre étude au moyen du mélange hexane/acétate d'éthyle a été réalisé avec un taux de récupération de 76% de l'huile essentielle utilisée. Ce taux reste faible par rapport à celui de **Oussou (2009)**. En effet, le fractionnement de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* réalisé par cet auteur a permis un taux de récupération de 99% de l'huile essentielle. Selon ce même auteur, cette perte serait retenue par la silice lors de la chromatographie.

2.2 Activité antibactérienne des huiles essentielles

D'après les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles étudiées, l'huile essentielle de *C. odorata* présente la meilleure activité sur l'ensemble des souches testées. Les activités des huiles essentielles de *A. conyzoides* restent modérées tandis que celles de *C. hirtus* sont faibles. Le potentiel inhibiteur des huiles essentielles a été confirmé par les tests de détermination de la CMI. La CMI la plus faible (64µg/mL) a été obtenue pour les huiles essentielles de *C. odorata* et *A. conyzoides* respectivement sur les souches de *S. aureus* 524C/13 et *S. aureus* ATCC 25923. Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* sont connues (**Avlessi et al., 2012**) avec des CMI de 1,28 mg/mL pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de 5,11 mg/mL pour *Escherichia coli* ATCC 25922. **Pertamawati & Nuralih (2008)** ont montré que l'huile essentielle de *A. conyzoides* est plus active sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif ; par contre elle est inactive sur toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de notre étude ont montré que l'huile essentielle de *C. hirtus* inhibe la croissance des souches de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* avec des CMI à 512µg/mL. Des résultats similaires sur l'efficacité des huiles essentielles du genre *Croton*, ont été rapportés par **Babili et al. (2009)**. Ces auteurs ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *C. campestris* était active sur les souches de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de certaines espèces du genre *Croton* ont été rapportées. En effet, **Babili et al.** en 2009 ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *C. campestris* était active sur *S. aureus*. **Matias et al.** en 2010 a mis en évidence les propriétés antibactériennes de l'extrait hexanique des feuilles de *C. campestris* sur *S. aureus*.

Les bactéries les plus sensibles à l'action des huiles essentielles étudiées sont les bactéries Gram positif. Cependant *E. cloacea* qui est une bactérie Gram négatif présente une CMI très basse (128 µg/mL). L'organisation structurale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est moins complexe que celle des bactéries à Gram négatif. Cette différence structurale la rend moins sensible à l'action des huiles essentielles et des extraits de plantes (**Kalemba & Kunicka, 2003**). Parmi les souches étudiées, *P. aeruginosa* s'est montrée résistante à toutes les huiles étudiées aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. En effet, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (**Mann et al., 2000**). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (**Hammer et al., 1999 ; Deans & Ritchie, 1987**).

Il est établi aussi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (**Oussou et al., 2008 ; Oussou et al., 2010 ; Saint, 2003, Kalemba & Kunicka, 2003**). La composition chimique des huiles essentielles étudiées pour leur activité antibactérienne est dominée par la présence de molécules hydrocarbonées. Le rapport liant l'activité antibactérienne des huiles essentielles à leur principaux constituants, ne sont pas applicables à l'huile d' *A. conyzoides*, *C. hirtus* et *C. odorata* car les composés hydrocarbonés sont peu, voir pas actifs (**Kalemba & Kunicka, 2003**). Cependant certains composés tels que β -caryophyllène, le germacrène-D, l' α -humulène et l'oxyde de caryophyllène identifiés comme composés majoritaires ont connus pour leurs propriétés antibactériennes (**Juteau et al., 2002**). Le β -caryophyllène dont la teneur est de 15,20 à 8,06% chez *A. conyzoides* et de 9,67% chez *C. odorata* est connu pour être actif sur *S. aureus* (**Kim et al., 2008**). L'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives présentes en faible proportion dans les huiles essentielles.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**). Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation des enzymes de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+): ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* (**Cox et al., 2000; Carson et al., 2002**).

2.3 Activité antibactérienne des fractions de l'huile essentielle de *Chromoleana odorata*

La variabilité des CMI des fractions vis-à-vis des souches étudiées traduit bien la variabilité de la composition chimique des différentes fractions. Les premières fractions obtenues avec 100% d'hexane sont constituées essentiellement de molécule hydrocarbonée moins polaire. Cette fraction hydrocarbonée qui constitue la fraction la plus importante de l'huile, serait constituée essentiellement des composés hydrocarbonés comme les germacrène-D, geigérène, prégeijérène, α -pinène, β -caryophyllène, β -pinène et δ -cadinène. Cette fraction est active uniquement sur les bactéries à Gram positif.

La seconde fraction est plus active que la première fraction et se caractérise par une CMI très basse sur les bactéries à Gram positif. Cette fraction serait vraisemblablement un mélange d'aldéhydes et

de quelques alcools, présentent une très bonne activité sur l'ensemble des bactéries testées. Ceci est conforme avec la littérature car, il est connu que les aldéhydes, notamment le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, ont une activité forte sur les bactéries. Les aldéhydes conjugués à une double liaison carbonique forment un arrangement très attracteur, ce qui pourrait expliquer cette activité. De tels composants interfèrent dans les processus biologiques impliquant le transfert des électrons et réagissent avec les composants nitrogénés tels que les protéines et les acides nucléiques donc l'inhibition de la croissance bactérienne (**Dorman & Deans, 2000**).

Les quatre fractions obtenues ont présenté une activité plus ou moins variée sur les souches testées. A l'exception de la fraction C₁, toutes les autres fractions C₂, C₃ et C₄ sont actives sur bactéries testées. L'activité antibactérienne des fractions C₂, C₃ et C₄ est nettement plus importante que celle de l'huile brute. La dernière fraction éluée avec l'acétate d'éthyle serait formée des quelques alcools. **Oussou (2009)** a montré que les fractions des essences de *Ocimum gratissimum* et de *Ocimum canum* riches en alcools tels que le thymol, le terpinéol-4 ou le géraniol présente une très bonne activité antibactérienne.

L'activité antibactérienne des fractions des huiles essentielle confirme bien l'hypothèse de **Hulin et al., (1998)** qui établit une échelle pour l'efficacité des constituants des huiles essentielles, comme suit : Phénols>alcools> aldéhydes> cétones> éthers>hydrocarbones >esters même si nous n'avons pas les résultats d'identification en cours de nos fractions chromatographiques.

2.4 Test de combinaison

Les études de combinaison de substances médicinales en général, et antibiotiques en particulier, sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature (**Rosato et al., 2007 ; Coutinho et al., 2011 ; Gauthami et al., 2012; Thiago et al, 2013 ;**). Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications clinique, car permettant de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (**Rosato et al., 2007**), limitant ainsi également de développement des phénomènes de résistances. C'est dans cette optique que l'huile essentielle de *Croton hirtus* a été testée en combinaison d'une part avec la gentamicine et d'autre part avec ceftazidime sur deux souches de références : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De façon générale, ces résultats ont permis de mettre en évidence deux types d'associations:

- Un effet potentialisateur entre l'huile essentielle de *C. hirtus* et les deux antibiotiques gentamicine de 64 à 16 µg/mL et la ceftazidime de 64 à 16 µg/ml sur la souche de *S. aureus* ATCC 25923
- Une action indépendante entre l'huile essentielle de *C. hirtus* et les deux antibiotiques gentamicine et la ceftazidime sur la souche de *E. coli* ATCC 25922.

Dans le cas des effets potentialisateurs, la combinaison huile/antibiotique (gentamicine) est particulièrement efficace sur *S. aureus* (CMI qui était de 64 passe à 16 µg/mL). Avec cette combinaison, les concentrations nécessaires de gentamicine et de ceftazidime nécessaires à l'inhibition de souches sont nettement réduites, de même que la concentration en huile essentielle, alors que cette huile n'était que très légèrement active lorsqu'elle est utilisée seule. La potentialisation de l'activité des antibiotiques par la méthode de dilution en milieu liquide a déjà été rapportée. En effet, **Thiago et al.**, en **2013** a mis en évidence des phénomènes de synergie pour la combinaison l'huile essentielle de *Croton campestis* avec les aminosides et les quinolones sur l'inhibition de la croissance de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. **Coutinho et al.**, en **2011** ont démontré que l'extrait de *C. campestris* potentialise l'action de la norfloxacine sur des souches multi résistantes de *S. aureus*. Les méthodes en phase vapeur sont utilisées dans les études de combinaisons de substances naturelles et antibiotiques. La combinaison des huiles essentielles de *Zanthoxylum articulatum*, *Vanillosmopsis arborea*, *Lippia microphylla* et *Croton zehntneri* avec les aminoglycosides et quinolones, est efficace sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* (**Rodrigues et al.**, **2009** ; **Coutinho et al.**, **2011**).

2.5 Activité antioxydante

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes. Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (**Oussou et al.**, **2009**, **Oussou et al.**, **2010** ; **Saint**, **2003**, **Kalemba & Kunicka**, **2003**). En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent une activité anti radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (**Benov.**, **1994**). En effet, l'huile essentielle de *C. grandiflorum* qui a présenté une plus grande activité antioxydante est riche en monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés (7,72 et 10,87%). La manifestation de ces activités est bien cohérente avec l'hypothèse ci-dessus. En plus les composés tel que le thymol sont connus pour sa forte propriété antioxydante. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier (**Rice-Evans et al.**, **1995** ; **Tepe et al.**, **2005** ; **Tepe et al.**, **2007**).

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des autres plantes (*C. odorata*, *C. hirtus* et *A. conyzoides*) ont montré une forte proportion de composés terpéniques hydrocarbonés. L'huile essentielle de *A. conyzoides* est dominée soit par le β -caryophyllène et le précocène I ou encore le germacrène-D. *C. hirtus*. (E)-caryophyllène, germacrène-D et α -humulène. *C. odorata* par le germacrène-D, géigerène, préagéijérène, α -pinène), β -caryophyllène, β -pinène et δ -cadinène. Pour **Mata et al.**, (**2007**), l'absence d'activité antioxydante des terpéniques hydrocarbonés serait due à

leur faible capacité donatrice d'un atome d'hydrogène et également de la faible solubilité des huiles essentielles dans les solvants utilisés tel que le méthanol ou l'éthanol. L'huile essentielle des tiges et des fleurs de *A. conyzoides* a donné des CI_{50} de 1970 $\mu\text{g/mL}$ et 3020 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Ces valeurs sont largement inférieures à celle de **Fatema (2013)**. En effet, Fatema a trouvé par la méthode de DPPH une CI_{50} de 46.01 $\mu\text{g/mL}$ en étudiant l'effet antioxydant de l'extrait métholique. Si les propriétés biologiques de *C. hritus* restent très peu connues à ce jour, certaines espèces du genre croton sont connues pour leurs propriétés antioxydantes. C'est le cas de *Croton lechleri*, dont l'activité antioxydante a été démontrée (**Lopes et al., 2004**).

A l'analyse des résultats on observe une sous-estimation par le test du DPPH. Ce fait, observé par **Arnao (2000)** et par **Kim et al., (2002)** s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 417 nm et par la non solubilité du DPPH en milieu aqueux. Malgré ces difficultés liées à l'usage du DDPH, il continue toujours à être utilisé. Cependant une bonne corrélation est établie entre les deux tests ($R_2 = 0,94$) tandis que **Delgado-Andrade et al., (2005)** auraient trouvé un coefficient de corrélation $R_2 = 0,97$ entre les deux tests. Cette corrélation voudrait dire que ces tests sont distincts ; chacun évaluant l'activité antioxydante de sa manière.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de chimie organique et biologique (Université Felix Houphouët Boigny) dont l'un des objectifs majeurs est la recherche de nouveaux principes actifs afin de valoriser les plantes utilisées en médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire. Nous avons pour cela sélectionné quatre plantes aromatiques médicinales utilisées par les populations dans le traitement de divers pathologies : *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus*, *Cardiospermum grandiflorum* et *Chromoleana odorata*. Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles de divers organes de ces plantes ont été effectuées. Après avoir déterminé leur composition chimique, nos efforts ont porté sur leur valorisation par le biais de la mise en évidence de leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes.

Les huiles essentielles issues de différents organes des plantes étudiées, ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un hydrodistillateur de type cleverger. La composition chimique des huiles essentielles extraites a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

Dans cette partie, il ressort que les plantes étudiées ont de faibles rendements en huiles essentielles. Des rendements allant de 0,60% pour les feuilles de *Croton hirtus* à 0,08% dans les parties aériennes de *Cardiospermum grandiflorum*. Les résultats de l'analyse de la composition chimique indiquent : Un chemotype riche en précocène I pour les fleurs et tiges de *Ageratum conyzoides*. Une abondance en sesquiterpènes hydrocarbonés pour l'huile essentielle de *Croton hirtus* dont les feuilles sont dominées par (E)-caryophyllène, germacrène-D et α -humulène alors que les tiges sont constituées à majorité de (E)-caryophyllène, α -humulène et l'oxyde de caryophyllène. On note également une abondance en sesquiterpènes hydrocarbonés avec un chemotype β -caryophyllène, (E)- β -farnesene, germacrène-D et α -himachalène pour l'huile essentielle des parties aériennes de *Cardiospermum grandiflorum* dont la composition chimique est réalisée pour la première fois.

Dans la seconde partie de cette étude, une évaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles obtenues a été réalisée. L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée sur des souches de références et des souches cliniques par les méthodes de diffusion et de microdilution en milieu liquide. Les huiles essentielles ont montré une activité plus ou moins variée. L'huile essentielle de *Chromoleana odorata* a montré une bonne activité antibactérienne aussi bien sur les souches cliniques que les souches de références, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans la troisième partie, l'huile essentielle de *Chromoleana odorata* dont la composition chimique avait préalablement été établie par notre équipe a été sélectionnée en vue de rechercher les molécules ou groupes de molécules impliquées dans son activité antibactérienne. Le choix de l'huile essentielle candidate à l'étude, a été orientée par le fait qu'elle est la seule à exercer une

bonne activité sur l'ensemble des souches étudiées. Par la suite, l'huile de *Chromoleana odorata* a été fractionnée en utilisant un éluant de polarité croissante par chromatographie sur colonne de silice. Les quatre fractions ont été testées pour leur activité antibactérienne. La fraction éluée avec l'acétate d'éthyle (100%) a présenté une plus grande activité sur l'ensemble des souches testées nettement supérieur à celle de l'huile totale brute.

La potentialisation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Croton hirtus* a été réalisée au cours de cette étude. Nous avons en particulier pu montrer que l'association de l'huile essentielle de cette plante avec deux antibiotiques classiques la gentamicine et la ceftazidime permettait de réduire considérablement les CMI des antibiotiques et donc de potentialiser leur activité notamment sur la souche de *S. aureus* ATCC 29523.

Enfin, les activités antioxydantes des huiles essentielles ont également été évaluées. Deux méthodes, à savoir la réduction relative du radical (DPPH) et le test de réduction de fer (FRAP) ont été utilisées. Les différents tests utilisés ont permis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des huiles étudiées, les huiles essentielles notamment de *C. grandiflorum* ont montré un pouvoir antioxydant intéressant avec une CI_{50} inférieure à celle de la vitamine C. Cette activité antioxydante qui serait due à sa teneur en composés oxygénés, expliquant ainsi l'usage traditionnel de cette plante dans le traitement des affections liées à l'activité antioxydante en particulier dans le traitement des œdèmes.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des huiles essentielles étudiées à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes ainsi que leurs propriétés antioxydants. Les huiles essentielles ont montré une activité plus grande sur les bactéries à Gram positif que les bactéries Gram négatif. Les huiles essentielles étant des mélanges complexes de plusieurs molécules, cette étude a également montré que les fractions riches en composés oxygénés possèdent une meilleure activité antibactérienne. Menées de façon rationnelle, ces études permettent d'éclairer les propriétés médicinales de certaines espèces et leur utilisation rationnelle par les tradipraticiens. De façon générale, ces travaux participent également à une meilleure connaissance des composés chimiques contenus dans les huiles essentielles et de la biovalorisation des plantes de la médecine traditionnelle ivoirienne, premier pas vers une meilleure préservation de la biodiversité végétale.

Afin de poursuivre cette étude, les molécules actives qui entrent dans la composition de l'huile essentielle de *Chromoleana odorata* devront être identifiées. Les différentes fractions obtenues par chromatographie sur gel silice dont les analyses des compositions chimiques sont en cours permettront de mieux nous éclairer d'avantage.

Une caractérisation du mode d'action des composés à activité antibactérienne des huiles essentielles de *Croton hirtus* et *Ageratum conyzoides* devra être également envisagée.

Une fois les molécules à activité antibactérienne identifiées, l'observation des effets produits sur la l'ultrastructure bactérienne sera réalisé par microscopie électronique à transmission. Des tests, comme le suivi de la concentration en ATP intra- et extracellulaire, la mesure de la fuite des ions K⁺ et la perte du matériel absorbant à 620 nm, permettront de compléter l'analyse, en précisant les modifications engendrées au niveau de la perméabilité membranaire.

Les molécules actives pourront être testées contre d'autres souches multi-résistantes aux antibiotiques, incluant des bactéries Gram négatif comme les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), et des bactéries Gram positif, comme les staphylocoques résistants à la méthicilline (SARM) ou la vancomycine (SARV).

La cytotoxicité de ces molécules devra être explorée sur culture cellulaire de même leurs tolérances biologiques. Ces molécules pourront servir de base à la production de médicaments traditionnels améliorés qui serviront de base au développement de nouveaux antibiotiques.

Parallèlement à la recherche de composés volatils à activité antibactérienne, un autre axe de recherche devra se développer sur les composés non volatils issus de *Ageratum conyzoides*, *Croton hirtus*, *Cardiospermum grandiflorum*. Ces deux plantes n'ont pas fait l'objet d'études phytochimiques et pharmacologiques. Cela nous permettra peut-être d'isoler des métabolites secondaires doués de propriétés biologiques.

La forte teneur en precocène I dans les huiles essentielles de *Ageratum conyzoides*, pourrait nous conduire à le séparer par chromatographie sur colonne de silice et de l'associer à des antibiotiques pour potentialiser son activité.

A vu des résultats des tests de synergie obtenus avec l'huile essentielle de *Croton hirtus*, nous proposons d'étendre cette étude a bon nombre d'huiles essentielles sur des bactéries multi résistantes, notamment les staphylocoques résistants a la méticilline.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aalbersger W.G.L. & Singh Y., 1991.** - Essential oil of Fijian *Ageratum conyzoides* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **6(2)**: 117-120.
- Abbiw DK., 1990** - Useful plants of Ghana, Intermediate Tech. Publication. London: *Royal Botanic Gardens, Kew*. 207.
- Achola KJ., Munenge R.W. & Mwaura A.M., 1994.** - Pharmacological properties of root and aerial parts extracts of *Ageratum conyzoides* on isolated ileum and Heart. *Fitoterapia*, **56**:103-109.
- Adams R.P., 2001.-** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured, Illinois, 455p.
- Adjanohoun, E. & Ake Assi L., 1979.** - Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire, Centre National de Floristique, Abidjan, 359 p.
- Agu S.I., 1980.** - Phytochemical investigation of Nigerian medicinal plants used in the treatment of skin disease. Thesis M.Sc. University de Ife, Nigeria.
- Ahmad I. & F. Aqil., 2007.** - In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 Medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, **162**: 264-275.
- Akah P.A., 1990.** - Mechanism of activity of *Eupatorium odoratum* L. *International Journal of Crude Drug Research*. **23**: 253-256.
- Akinyemi K.O., Oladapo O., Okwara C.E., Ibe C.C. & Fasura K.A., 2005.** - Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South West Nigerian unorthodox medicine for antimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **5**: 68.
- Akoua K. , Guessennnd N., Gbonon V., Faye Ketté H., Dosso M. 2004.-** Methicillin resistance of *Staphylococcus* in Abidjan 1998-2001: A new problem. *Médecine et maladies infectieuses*; **34 (3)**:132-6.
- Alekshun M.N & Levy S.B., 2007.-** Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. **128**: 1037-1050

- Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A. & Bora U., 2008.-** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International Journal*, **41**: 1–15.
- Alma M.H., Mavi A., Yildirim A., Digrak M. & Hirata T., 2008.-** Screening chemical composition and *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1725-1729.
- Aluka C., 2008.-** *Cardiospermum grandiflorum* Swartz (Family Sapindaceae). (cited 2009 November 100). Available from: <http://www.wikipedia.com>.
- Amal M.M.N, Sami A.K., Marcel K., Reto B., Wai E.A. & Thomas J.S., 2010. -** The antiprotozoal activity methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **129**: 127–130.
- Amaral J.A., Ekins A., Richards S.R. & Knowles R., 1998. -** Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 520-525.
- André R. 1998.-** La maladie de parkinson. Ed. Masson. 16-19.
- Arnao M.B., 2000.-** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, **11** (11): 419-421.
- Aruoma O.I., 1998. -**Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of American Oil Chemist Society* **75**: 199-212
- Aurousseau B. 2002.-** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA. *Product of Animal*. 15: 67-82.
- Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénou B., Menut C. & Sohounhloué D., 2012.-** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, **1(3)**: 7-13.

- Ayensu E.S, 1978.** - Médicinal plants of West Africa. Reference Publications Inc., Algonac, Michigan. p. 162.
- Babili F.E., Moulis C., Bessiere J.M., Roques C. & Haddioui L., 2009.-** Essential oil leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, its secretory elements, and its biological activity. *Journal of Essential Oil Research*. **21**: 272–275.
- Bamba D., Bessière J.M, Marion C., Péliissier Y. & Fourasté I., 1993.-** Essential oil of *Eupatorium odoratum*. *Planta Medica*, **59(2)**: 184-185.
- Banso A., 2007.** - Comparative studies of antimicrobial properties of *Cardiospermum grandiflorum* and *Cardiospermum halicacabum*. Nig. *Journal of Health and Biomedical Sciences*, **6(1)**: 31-34.
- Barel S., Segal R. & Yashphe J., 1991.** - The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacology*. **33**: 187-191.
- Bedi G., Tonzibo Z.F., Chalchat J.C. & N'Guessan Y.T., 2001.-** Composition chimique des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* L. King Robinson (Asteraceae) Abidjan Côte d'Ivoire. *Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie*. **11**: 29-37.
- Bedi G., Tonzibo Z.F., Chopard C. & N'Guessan Y.T., 2004.-** Etude des effets antidouleurs des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, par action sur la Lipoxigenase L-1 de soja. *Physical Chemical News*. **15**: 124-127.
- Bedi G., Tonzibo Z.F., Oussou K.R., Chopard C., Mahy J.P. & N'Guessan Y.T. 2010.-** Effect of essential oil of *Chromolaena odorata* (Asteracea) from Ivory coast, on cyclooxygenase function of prostaglandine-H synthase activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **4(8)**: 535-538.
- Benov L. & Georgeiv N., 1994.-** The antioxidant activity of Flavonoids Isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*. **8(2)**: 92-94.
- Benzie I.F., Strain J.J., 1996.-** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: **1**:70-76.
- Bioka, D., Banyikwa F.F. & Choudhuri, M.A., 1993.** - Anagestic affects of a crude extract of *Ageratum conyzoides* in the rat. *Acta Horticulturae*, **332**: 171-176.
- Boira H. & Blanquer A., 1998.-** Environmental factors affecting chemical variability of essential

oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematic and Ecology*, **26**:811-822.

- Bonnefond-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J.L., Terond P., Legrand A. Delattre J. 2002.-** Stress oxydant, fonction vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16**: 260-267.
- Boti J.B., 2004.** -Contribution à la caractérisation de plantes aromatiques de Cote d'ivoire et de corse ; apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielle et d'un extrait. Doctorat des Université de Corse et de Cocody-Abidjan, 223 p.
- Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Kouakou G., N'guessan Y.T. Costa J. & Casanova. 2006. -** Combined analysis of cymbopogon giganteus Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and 13-NMR. *Compte rendu de Chimie*. **99** : 164-168.
- Bouboutou O.H.R., Loukou Y.G. & Tako Ioussor D., 1995.-** Evaluation de l'activité antidiarrhéique de quelques plantes utilisées en Afrique et en Côte d'Ivoire. *Revue de médecine et pharmacopées africaines* : **9 (1)** : 31-35.
- Bouda H., 2001. -** Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. **37(2)**: 103-109.
- Boyle W., 1955. -** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*. **66**: 25-28.
- Bracho R. & Crowley K.J., 1966.-**The essential oils of some Venezuelan Croton species. *Phytochemistry*, **5**: 921-926
- Brojendro S.S., Radhapiyari W.D., Marina A., Indira W.D., Swapana N., Chingakham B. Singh., 2013.-** Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. **7(8)**: 371-385.
- Bruneton J., 1999.-** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L., 2000. -** Biochemistry & Molecular Biology of plants. *American Society of plant Physiologists*: Rockville, MA, p 1367.
- Burkill H.M., 1985.-** The Useful Plants of West Tropical Africa, vol. 1. Kew: Royal Botanic Gardens.

- Burt S., 2004.-** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. **94**: 223-253.
- Butaye P., Cloeckaert A., Schwarz S., 2003.-** Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **22**: 205-210
- Campos A.R., Albuquerque F.A.A., Rao V.S.N., Maciel M.A.M & Pinto A.C. 2002.-** Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia*. **73**(2): 116-120.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokemen A. & Akpulat H.A., 2003.-** Antioxydant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achilla millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **87**: 215-220.
- Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V., 2002.-** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1914–1920.
- Chao S.C., Young D.G. & Oberg C.J., 2000. -** Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *Journal of Essential Oil Research* **12**: 639-649.
- Chavéron H., 1999.-** Molécules toxiques. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle », TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 98 pp.
- Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. & Gaydou E.M., 1996.-** Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medecine*. **20**: 35 - 43.
- Coutinho H.D.M., Matias E.F.F., Santos K.K.A., Santos F.A.V., Morais-Braga M.F.B., Souza T.M., Andrade, J.C., Souza C.E.S., Tintino S.R., Guedes G.M.M., Falcão- Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., Costa J.G.M., 2011.-** Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum*. *Biomédica*, **31**: 608-612.

- Coutinho H.D.M., Rodrigues F.F.G., Nascimento E.M.M., Costa J.G.M, Falcão-Silva V.S, Siqueira-Júnior J.P., 2011.-** Synergism of gentamicin and norfloxacin with the volatile compounds of *Lippia microphylla* Cham.(*Verbenaceae*). *Journal of Essential Oil Research*, **23**: 24-28.
- Cowan M.M., 1999-** Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-582.
- Cox S.D., Man C.M0, Markham J.L., 2001.-** Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 492-497.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J. E., Warmington J. R., & Wyllie S.G., 2000.-** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* **88**: 170-175.
- Davidson P.M., 1997.-** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington.*Food Microbiology*. 520-556 p.
- De Lima S.G., Medeiros L.B.P., Cunha C.N.L.C., Silva D., Da D.N.C., Neto J.M., Moita L.J.A.D., Steffen R.A., Araújo B.Q. & Reis F.A.M., 2012.-** Chemical composition of essential oils of *Croton hirtus* L'Her from Piauí (Brazil) *Journal of Essential Oil Research*. **24 (4)** : 371
- De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. & Lekeux P. 2005.-** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animale. Médecine. Vétérinaire*. 149: 1-9.
- De Sousa A.C, Alviano D.S, Blank AF, Alves P.B, Aliano C.S, Gattass C.R., 2004.-** *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **56**: 677-681.
- Deans S.G. & Ritchie G., 1987.-** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* **5**:165-180.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. & Mazza G. 2002.-** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **74**:101-109.
- Delgado-Andrade C., Rufiaän- Henares, J.A. & Morales, F.J., 2005.-** Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods *Journal of*

- Diehl M., 1998.-** Activité anthelminthique de plantes médicinales présentes en Côte d'Ivoire. Travail de diplôme. Institut de Zoologie, Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, Suisse, 114 p.
- Djaman A. J., Dje M.K. & Guede guina F. 1998.** Evaluation d'une action antiplasmodiale de *Olox subscorpioidea* sur les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* : **12** : 177-182.
- Dorman H.J. & Deans S.G., 2000.-** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatils oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 308-316.
- Duke J.A, 1990.-** Promosing phytochemicals. In: advances in new crops. Janick J. and Simon. Timber press, Portland.491-498.
- Duraffourd C., D'Hervicourt L. & Lapraz J.C., 1990.-** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
- Durodola J.I, 1997.-** Antibacterial property of crude extracts from a herbal wound healing remedy *Ageratum conyzoides* L *Planta Medica*. **32**: 388-390.
- Ekundayo O., Sharama S. & Roa E.V., 1988.-** Essential oil of *Ageratum conyzoides* L. *Planta medica*. **54**: 55-57.
- Fatema N., 2013.-** Antioxidant and cytotoxic activities of *Ageratum conyzoides* stems. *International Current Pharmaceutical Journal*. **2**: 33-37.
- Fauchère J.L. & Avril J.L., 2002.-** "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris, 365 p.
- Favier A., 2003.-** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
- Gauthami R., Sudhakara R.G, Karthik K., 2012.-** Evaluation of Antibacterial Effect of *Vernonia Anthelmintica* seed Extract and Its Synergistic Effect with Antibiotics on Resistant Bacterial Strains. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **3**: 79-81.

- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. and Fonseca Maria J.V., 2003.-** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. **2**: 5p.
- Githens T.S, 1948.-** Drug plants of Africa. *African Handbooks*., **8**: 59.
- Gonny M., Bradesi P. & Casanova J., 2004.-** Identification of the components of the essential oil from Corsican **Daucus carota** L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**: 424-433.
- Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker L.J., Cars O., Davey PG., 2006.-** National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **62**: 373-379.
- Grassi-Kassisse D.M., Wolf-Nunes V., Miotto A.M., FariasSilva E., Souza-Brito A.R.M., Nunes D.S. & SpadariBratfisch R.C.J. 2003.-** Sensitivity to b-adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **55(2)**: 253-257.
- Groussard C. 2006.-** Stress oxydatif et exercice anaérobie. Oxidative stress and anaerobic exercise. *Science & Sports*. **21** : 201-209.
- Guessennd K.N., Loubienga S.W., Gbonon V., Kouassi M'Bengue A., Kacou N'Douba A. & Dosso M., 2004.-** Résistance aux antibiotiques de 241 souches de *Escherichia coli* isolées des infections urinaires des patients hospitalisés au CHU de Cocody à Abidjan. *Internationa Journal of Biological Sciences*, **5(1)** : 38-45.
- Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., KacouN'Douba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M.; Courvalin P., 2008.-** Résistance aux quinolones de type *qnr* chez lez entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie* **56** : 439-446.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 2004.-**Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe" *International Journal of Antimicrobial Agents*. **23(3)**:209-212.
- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V., 1999.-** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 985–990.
- Hayes A.J. & Markovic B., 2002.-** Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora*(Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. **40**: 535-543.

- Hayes A.J., Leach D.N., Markham J.L., & Markovic B.J., 1997.-** In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *Essential Oil Research*. **9**: 575-582.
- Heath H.B., 1981.** Source Book of Flavours. Westport: Avi, pp.890.
- Henty E.E. & Pitchard G.H., 1973.-** Weeds of New Guinea and their control. Papua New Guinea Botany Bulletin 7.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. & Dufossé L., 1998.-** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, **18**: 563-582.
- Inya-Agha S.I., Oguntimein B.O., Sofowora A. & Benjamin T.V., 1987.-** Phytochemical and antibacterial studies on the essential oil of *Eupatorium odoratum*. *International Journal of Crude Drug Research*, **25**: 49-52.
- Irobi O.N., 1997.-** Antibiotic properties of ethanol extract of *Chromolaena odorata* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacognosy*, **2**: 111-115.
- Iwu M.M., Duncan A.R. & Okunji C.O., 1999.-** New antimicrobials of Plant Origin. In: Perspectives on new crops and new uses. Ed.: Janick, J., ASHS Press, Alexandria, VA., 457-462.
- Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M & Yusuf S., 1995.-** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Annals of Internal Medicine*. **11**:860-72.
- Jose F.G, Magalhaes, Cyntia F.G, Viana, Antonio Gilson M, Aragão Junior, Vanessa G. Moraes, Ronaldo A, Ribeiro, Marcus R, Vale., 1997.-** Analgesic and antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. *Phototherapy. Research*. **11(3)**:183-188.
- Juliano R.L & Ling V.A., 1976.-** Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica Biophysica Acta*. **455**: 152-162.
- Juteau F., Masotte V., Bessiere J.M. and Viano J., 2002. –** Composition and characteristics of essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Biochemical Systematic and Ecology*, **30**:1065-1070.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., & Weisslowicz H., 1994.-** Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**: 626-631.

- Kalemba D. & Kunicka A., 2003.-** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **10**: 813-829.
- Kamanzi A.K. 2002.** Plantes médicinales de Côte d'Ivoire : investigations phytochimiques guidées des essais biologiques. Doctorat d'Etat ès-Sciences en biologie végétale. UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, 190 p.
- Karousou R., Koureas D.N. & Kokkini S., 2005.-** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Saturejathymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, **66**: 2668-2673.
- Kasturi TR, Thomas M & Abraham EM., 1973.-** Essential oil of *Ageratum conyzoides*, Isolation and structure of 2 new constituents. *Indian Journal of Chemistry*, **11**: 91-95.
- Kerharo J. & Adam J.G., 1974.-** La pharmacopée senegalaise traditionnelle: plantes. Médicinales et toxiques, vol. 1. Paris: Vigot. p. 101.
- Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J. & Lee C.Y., 2002.-** Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic *Phytochemicals Journal of Agricultural Food Chemistry*. **50**: 3713- 3717.
- Kim Y.S., Park S.J., Lee E.J., Cerbo R.M., Lee S.M., Ryu C.H., Kim G.S., Kim J.O., Ha Y.L. 2008.-** Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of β -caryophyllene. *Journal of Food Chemistry*. **73**:540-545.
- Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G., 2006.-** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem*. **13**: 54-60.
- Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H. & Weis N., 1989.-** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* **1**: 119-128.
- Kokwaro J.O., 1976.-** Medicinal plants of East Africa. Nairobi: East African Literature Bureau.58.
- koné M.W. 1998.-** Evaluation de l'activité antibactérienne des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans la région de Ferkessédougou (Côte d'Ivoire. Mémoire pour obtention du diplôme d'études approfondies en Ecologie tropicale, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, 62 p.

- Kottaimuthu R. & Vasudevan N., 2012.-** Identity and distribution of *Croton hirtus* L'Herit (Euphorbiaceae) - A fast naturalizing invasive species in Tamil Nadu. *Elixir Bio Diversity*. **50**: 10462-10464
- Kouamé-Bi K.F.P., 2012.-** Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.
- Lahlou M., 2004.-** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. **18** : 435-448.
- Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J. & Nychas. 2001.-** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453-462.
- Lamien-Meda A., C.E. Lamien, M.M.Y. Compaore, R.N.T. Meda and M. Kiendrebeogo., 2008.-** Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, **13**: 581-594.
- Landis G.N. & Tower J., 2005.-** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*. **126**: 365–379.
- Laub G.R., 1986.-** Discovery of the sulfa drugs. *Southern Medical Journal*, **79**: 782
- Le T.T., 1995.-** The use of Eupolin prepared from *Eupatorium odoratum* to treat soft tissue wounds., in The 5th European Tissue Repair Society Meeting Abst. **30**: Padova, Italy.
- Lee J., Koo N. & Min D.B. 2006.-** Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **1**: 21-33.
- Levy S.B & Mc Murry L., 1978.-** Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature*. **276**: 90-92.
- Lopes M.I., Saffi J., Echeverrigaray S., Pêgas Henriques J.A. & Salvador M., 2004.** Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, **2-3**: 437-445.
- Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L., 2000.-**The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributrs to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 294-297.

- Margulis L. & Sagan D., 1989.-** "L'univers bactériel" Collection Points, Série Sciences, Albin Michel. 339 p.
- Markham P.N. & Neyfakh A.A., 2001.-** Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria, *Current Opinion Microbiology*, **5**:509-514.
- Massion P., Preise R.J.C. & Balligand J.L. 2002.-** Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. Reactive nitrogen species : deleterious or not. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16**: 248-252.
- Mata A.T.; Proença C.; Ferreira A.R.; Serralheiro M.L.M.; Nogueira J.M.F & Araújo, M.E.M. 2007.-** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. *Food Chemistry*, **103**: 778–786.
- Matias E.F.F., Santos K.K.A., Costa J.G.M. & Coutinho H.D.M., 2010.-** Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris*, *Ocimum gratissimum* and *Cordia verbenaceae* DC). *Asian Biomed*, **1** :183–186.
- Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R0., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A., 2007.-** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. **40**: 839-847.
- Mc Lafferty F.w. & Stauffer DB., 1994.-** Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. Mass spectrometry.
- Menut C., Lamaty G., Amvan P.H., 1993.-** Aromatic plants of tropical central Africa part x: Chemical composition of essential oil of *Ageratum conyzoides*. *Flavour and Fragrance Journal*, **1**: 1-4
- Mobié M., Bonga G.M., Vangah-manda M., De souza C. & Guede-guina F.R., 1997-1998.-** Action antifongique d'une huile végétale sur *Trichophyton rubrum*, *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* : **(11-12)** : 185-192.
- Mojab F., Kamalinejad M., Ghaderi N. & Vahidipour H.R., 2003. -** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iran Journal of Pharmaceutical Research*. **3**: 77-82.
- Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M0, Sætton M.F. & Boldrini E., 2002.-** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, **237**: 209-214.

- Moody J.O, Adebiyi O.A. & Adeniyi B.A, 2004.-** Do Aloe vera and Ageratum conyzoides enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu) *J. Ethnopharmacol*, **92**:57-60.
- Moses S.O., Akintayo O., Kamil O.Y., Labunmi L., Heather E.V., Jessika A.T & William N., 2010.-** Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria. *Records of Natural Product*. **1**: 134-137.
- Murray P.R., Rosenthal, K.S. Pfaller M.A., 2009.-** Medical Microbiology Elsevier edn., Philadelphia, pp. 960.
- Muthu C., Ayyanar M. Raja, N. & Ignacimuthu S., 2006.-** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi:10.1186/1746-4269-2-43.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5 th edition volume 17. Approved standards-M7-A4. NCCLS document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne Pa.
- Nébié R.H.C., Yaméogo R.T, Bélanger A. & Sib F.S., 2004.-** Composition chimique des huiles essentielles d'*Ageratum conyzoides* du Burkina Faso. *Comptes Rendu de Chimie* **7**: 1019–1022.
- Neetu A., Sangeeta C., Anita S., Matadeen B. & Neera S., 2011.-** Efficacy of *Ageratum conyzoides* against the control of mosquitoes. *International Journal of pharmaceutical Sciences and Review*. **12**: 3235-3237.
- Newman D.J, Cragg G.M & Snader K.M., 2003.-** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Product*, **66**: 1022-1037.
- N'guessan K., 2008.** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles chez les peuples Abbey et Krobou du Département d'Agboville (Côte-d'Ivoire). Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles. Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 235 p.
- Nguyen X.D., Le K.B. & Leclercq P.A., 1992.-** The constituents of the leaf oil of *Chromolaena odorata* (L) R. M. King and Robinson from Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*, **4**: 309-310.

- Noble W.C., Virani Z., Cree R.G., 1992.-** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. **72**: 195-198.
- Normak H.B., & Normak S., 2002.-** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**: 91-106.
- O.M.S, 2002.-** Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.
- Okunade A.L., 2002.-** *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia* **73**:1-6.
- Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C. and Ferri P.H., 2005.-** Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 275-285.
- Ouattara D., 2006.-** Contribution à l'inventaire des plantes médicinales significatives utilisées dans la région de Divo (Sud forestier de la Côte-d'Ivoire) et à la diagnose du poivrier de Guinée : *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae). Université de Cocody-Abidjan, Côte-d'Ivoire, 184 p.
- Oussou K.R., 2009. –**Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Guessennnd K. N., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2008.-** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Reaserch*. **1**: 94-103.
- Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2010.-** Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimumgratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Reaserch*. **1**: 50-59.
- Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER), 2007.-** *Cardiospermum grandiflorum*. Summary: General information, including: Description, some distribution, common names and habitat.

- Pamo E.T., et al., 2004-** Composition chimique et effet acaricide des huiles essentielles des feuilles de *Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson. et d'*Eucalyptus saligna* Smith. sur les tiques (*Rhipicephalus lunulatus* Neumann) de la chèvre naine de Guinée dans l'Ouest-Cameroun. *Livestock Research for Rural Development*. **9**: p.19.
- Parejo I., Codina C., Petrakis C. & Kefalas P., 2000.** -Evaluation of scavenging activity assessed by col (II) EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of pharmacology and toxicological methods*, **44**:507-512.
- Parekh J. & V. Sumitra., 2007.-** *In vitro* Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian T. Medicinal Plants, *Turkish. Journal of Biology*., **31**: 53-58.
- Patil R.P., Nimbalkar M.S., Jadhav U.U., Dawkar V.V. & Govindwar S.P., 2010.-** Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*., **4**: 608-614.
- Pertamawati N. & Nuralih ., 2008.-** Chemical components and biological activities of volatile oil of *Ageratum conyzoides* L. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*. 586-588.
- Phan T.T., Hughes M.A., Cherry G.W., Le TT. & Pham H.M., 1996.-** An aqueous extract of the leaves *Chromolaena odoratum* (formerly *Eupatorium odoratum*) (eupolin) inhibits hydrated collagen lattice contraction by normal human dermal fibroblasts. *Journal of Alternative and. Complementary.Medicine*. **3**: 335-343.
- Phan, T.-T., 2001.-** Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* Protect cultured skin cells from oxidative damage: Implication for cutaneous wound healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*., **12**: 1373 - 1379.
- Pibiri P., 2005.-** Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse). 161p.
- Pincemail J. & Defraigne J.O. 2004.-** Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone. 23/10/2004.

- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. & Defraigne J. O. 2002.-** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, *Nutrition clinique et métabolisme*. **16** : 233-239.
- Pincemail J., Defraigne J.O. & Limet R. 2001.-** Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère*. 130 p.
- Poole K., 2004.-** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. **10**: 12-26.
- Pousset, J.L., 1994.-** Plantes médicinales africaines. Le pharmacien d'Afrique : 87, 6.
- Prescott L.M., Harley J.P. & Klein D.A., 1995.-** Microbiologie. De Boeck ed. p 1014.
- Pryor W.A., 2000.-** Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biology and Medicine*, **28**: 141–164.
- Radulovic N., Hananjarasoa E., Harinantenaina L., Yoshinori A., 2006.-**Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**: 648-653.
- Rahman A.U, Nasim S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. 2003.-** Antiinflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, **2-3** : 177-180.
- Rice L.D., Sahm D. Bonomo, R.A., 2003. -** Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray, P.R. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 1, eighth ed. ASM Press, Washington, p. 1074.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. & Pridham J.B., 1995.-** The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **(4)**: 375-383.
- Rodrigues F.F.G., Costa J.G.M. & Coutinho H.D.M., 2009.-** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, **16**:1052–1055.
- Ros, A., 1999.-** "La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques", Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHU de Saint-Etienne. 3.
- Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D. & Milillo M.A, 2007.-** Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* **14** : 727-732.

- Russo M., Galletti G.C., Bocchini P. & Carnacini A., 1998.-** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3741-3746.
- Saint Laumer D.J.Y., Frérot E. & Herrmann A., 2003.-** Controlled release of perfumery alcohols by neighboring-group participation. Comparison of the rate constants for the alkaline hydrolysis of 2-acyl-, 2-(hydroxymethyl)-, and 2-carbamoylbenzoates; *Helvetica Chimica Acta* **86**: 2871-2899.
- Salatino A., Salatino M.L.F., Negri G., 2007.-**Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton spices (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian chemical society*. **1**: 11-33.
- Salzer U.J., 1977.-** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-acritical review. *C.R.C Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. **9**: 345-373.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J. & Reglero G., 2005.-** Chemical composition activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. **68**: 790-795.
- Secco, R.S., 1992.-** Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Bot.* **8**: 265-281.
- Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P. 1990.-** Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radical Biology and Medicine*. **8**: 145-152.
- Sharma P.D. & Sharma O.M.P., 1995.-** Natural products chemistry and biological properties of the *Ageratum* plant. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **50**:213.
- Siani A.C., Ramos M.F, Menezes-de-Lima O.J.R., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G. & Henriques M.G.C., 1999.-** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from leaves and resin of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*. **66**: 57-69.
- Sidney G. De Lima, Antônia M. G. L.Citó, José A. D. Lopes, José M. M. Neto, Mariana H. Chaves, Edilberto R. Silveira., 2010.-** Fixed and volatile constituents of genus croton plants: *C. adenocalyx*. *Revista Latinoamericana de Química*. **3**: 133-144.

- Sikkema J., De Bont J.A.M. & Poolman B., 1995.-** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **59**: 201-222.
- Silva J.S., 2010.-** Synopsis des espèces de Croton L. (Euphorbiaceae) dans l'état de Pernambuco, au Brésil. *Acta botanica Brasilica*. **2**: 441-453.
- Singh S.B & Barrett J.F, 2006.-** Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*. **71**: 1006-1015.
- Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. & Sarkinas A. 2006.-** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*. **18**: 698-703.
- Sood V.K., 1973.-** Chemical examination of the flower oil of *Ageratum conyzoides* L. *Flavour Industry* ;4:77.
- Soumyanath A., 2006.-** Traditional medicines for modern times antidiabetic plants ,C NC press Boca, FL, PP 197-199.
- Suárez A.I.; Compagnone R.S.; Salazar-Bookaman M.M.; Tillet S.; Delle Monache F.; Di Giulio C.; Bruges G., 2003.-** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **1** : 11-4.
- Surk K.I. & Nielsen P.V., 2003. -** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology*; **99**: 665-674.
- Svoboda K.P. & Hampson J. B., 1999.-** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>.
- Tamer F.M.D., 2003. –** Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. Internal Medicine Articles
- Tepe B., Sihoglu-Tepe A., Daferera D., Polissioub M. & Sokmenc A., 2007.-** Chemical composition and activity of the essential oil *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, **3**: 766-770.

- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. & Sokmen A., 2005.** - Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *roslans*, *Journal of Food Engineering*, **4**: 447-454.
- Thakong K., 1999.-** A study on the antimalarial constituents and chemical composition of *Eupatorium odoratum* (L.). Mahidol University: Mahidol, THAILAND.
- Thiago S.A., João B.T.R., Fabíola F.G.R., Adriana R.C. & José G.M.C., 2013.-** Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of Croton. *Industrial Crops and Products*, **44** : 630– 633.
- Tomi F & Casanova J., 2006.-** ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* - a review. *Acta Hort.* **723**: 185-192.
- Tonzibo Z.F., 1998.-** Contribution à l'étude des huiles essentielles des espèces acclimatées en Côte d'Ivoire. *Eucalyptus citrodora*, *Ocimum gratissimum* et *Ocimum basilicum*. Thèse de 3eme cycle, chimie organique, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 136 p.
- Tra Bi F.H., 1997.** Utilisation des plantes, par l'homme, dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 212 p.
- Traoré A., Datte Y.J., Offoumou A.M., AKA K.J. & Sawadogo L.L. 1999.-** Effets antihypertensifs de l'extrait aqueux de *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) sur la pression artérielle de mammifères. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* : **13**, 41-48.
- Triratana T., Suwannuraks R., & Naengchomnong W., 1991.-** Effect of *Eupatorium odoratum* on blood coagulation *Journal of the Medical. Association of Thailand*, **5**: p. 283-287.
- Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., delage C. & Duroux J.L. 2003.-** Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea. *Food and chemistry*. **3**: 399-407.
- Ultee A., Bennik M.H & Moezelaar R. 2002.-** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 1561-1568.

- Umezu T., 1999.-** Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **64**: 35-40.
- Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B. & Sokmen A., 2002.-** Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achilla setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*. **83**: 117-121
- Usman L.A., Zubair M.F., Olawore N.O., Muhammad N.O., M'Civer F.A & Ismaeel R.O. 2013.-** Chemical Constituents of Flower Essential Oil of *Ageratum conyzoides* growing in Nigeria. *Elixir Organic Chemistry*. **54** :12463-12465.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D & Mazur M. 2007.-** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **39**: 44-48.
- Vangah-manda M., Dje M., Guede-guina F.K. et de Souza, C. 1994.-** Evaluation des effets antimicrobien et cytotoxique des extraits aqueux totaux de *Thonningia sanguinea* Vahl. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* : **8 (2)**: 153-157.
- Vangah-Manda M.O., 1986.-** Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées par les ethnies Akans de la région littorale de la Côte-d'Ivoire. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Nationale de Côte-d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire, 464 p.
- Vekiari SA, Protopapadakis EE, Papadopoulou P, Papanicolaou D, Panou C. & Vamvakias M., 2002.-** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **5(1)**: 147-153.
- Vera E.J., 1993.** Chemical composition of essential oil of *Ageratum conyzoides* L. from Reunion. *Flavour and Fragrance Journal.*, **8**: 256-260 .
- Vigor C., Fabre N., Fourasté I. & Moulis C., 2001.-** Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. *Phytochemistry*, **8**: 1209-1212.
- Vinoth B. & Manivasagaperumal R., 2013.-** Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Cardiospermum halicacabum* Linn International Journal of Current Science and Technology, **1**: 009 – 012.
- Virost S., 2004.-** Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha\beta$ -cristalline. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1.

- Walker J.E.M, Saraste M.J, Runswick and N.J.Gay., 1982.-** Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The Embo Journal*, 1(8): 945-51.
- Walsh, C., 2003.-** Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.
- Wan J., Wilcock A. & Coventry M.J., 1998.-** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 152-158.
- Wandji J., Bissangou M.F., Ouambra J.M., Silou T., Abena A. & Keita A., 1996.-** Allelochemicals from *Ageratum conyzoides* L. and *Oryza sativa* L. and their effects on related Pathogens. *Fitoterapia*. **67**:427.
- Wang B.S., Li B.S. & Zeng Q.X., 2008.-** Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry*. **107** : 1198-1204.
- Wannissorn B., Jarikasem S., Siriawangchai T., Thubthimthed S., 2005.-** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. **76**: 233-236.
- Waterhouse B.M. & Mitchell A.A. 1998.-** Northern Australia Quarantine Strategy: weeds target list, Second Edition. Australian Quarantine & Inspection Service, Miscellaneous Publication No. 6/98.
- Weiss C., 1997.-** Ethnobotanische und pharmakologische Studien zu Arzneipflanzen der traditionellen Medizin der Elfenbeinküste. Universität Basel, 134 p.
- Welzen P.C.V & Chayamarit K., 2007.-** Euphorbiaceae, in Flora of Thailand. National Herbarium Nederland, Leiden; Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok. Available at <http://www.nationaalherbarium.nl/thaieuph/ThCspecies/ThCrotonT.htm>.
- Wendakoon C.N. & Sakaguchi M., 1995.-** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* **58**: 280-283.
- Yagupsky P., 2006.-** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*. **25**: 974-976
- Yamamoto LA, Soldera JC, Emim JAS, Godinho RO, Souccar C, Lapa AJ, Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro., 1991.-** Suppl II: 145.

- Yildirim A., Mavi A., Kara A.A., 2001.-** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**: 4083-4089.
- Zakaria, M. & Mohd M.A., 1994.-** Traditional Malay Medicinal Plants Malaysia: Ed. Fajar Bakti.
- Zani F., Massimo G., Benvenuti S., Bianchi A., Albasini A., Melegari M., Vampa G., Bellotti A. & Mazza P., 1991.-** Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and Salmonella/Microsome Reversion Assay. *Planta Medica* **57**: 237-241.
- Zhao R.J., Koo B.S., Kim G.W., Jang E.Y., Lee J.R., Kim M.R., Kim S.C., Kwon Y.K., Kim K.J., Huh T.L., Kim D.H., Shim I., Yang C.H., 2005.-** The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **28**: 2323-2326
- Zihiri G.N., Mansoor A., 1996.-** Effet of water extract of *Cardiospermum grandiflorum*. Swart on the Gravid female Rat uterus. *Phytotherapy research*, **10**: 167-169.
- Zinzendorf, Y., 1989.-** Contribution à l'étude des plantes médicinales utilisées en Odontostomatologie traditionnelle. Mise en évidence des activités bactériostatique et bactéricide, proposition d'une formule galénique. Thèse, Faculté de Pharmacie, Université d'Abidjan, 180 p.

ANNEXES

Annexe 1: Les milieux de culture

Muller Hinton agar :

Infusion de viande de bœuf deshydraté	300 g
Hydrolysate de caseïne.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	5 g
Agar agar.....	13 g
Eau distillée.....	1000 mL

Bouillon nutritif :

Peptone	5 g
Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure	2 g
Chlorure d sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 mL

Annexe 2: Les antibiotiques

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque (µg)
Fosfomycine	FOS	50
Mécillinam	MEC	10
Imipenème	IPM	10
Norfloxacine	NOR	5
Céfépime	FEP	30
Ceftriaxone	CRO	30
Cefoxitine	FOX	30
Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	30
Céfixime	CFM	10
Amoxicilline	AMX	25
Céfalotine	CF	30
kanamycine	K	30
Gentamicine	GM	15
Amikacine	AN	30
Nétilmicine	NET	30
Sulfaméthoxazole-trimethoprine	SXT	25
Rifampicine	RA	30
Tétracycline	TE	30
Colistine	Cs	50
Chloramphénicol	C	30
Piperacilline	PIP	75
Minocycline	MNO	30
Ciprofloxacine	CIP	5
Lincomycine	LCN	15
trimethoprine	SXT	25
Acide nalidixique	NA	30
Céfuroxime	CXM	30
Oxacilline	OX	5
Sulfamide	SSS	200
Ticarcilline +Acide Clavulanique	TICC	17
ticarcilline	TIC	75
Aztréonam	ATM	30
Tobramycine	TOB	10
Pipéraciline	PIP	75
Erythromycine	E	15
Pristinamycine	P	15
Vancomycine	VA	30
Teicoplanine	TE	30

Publication et participation à des congrès

Publications

Touré Daouda., Kouamé Prevost, Bedi Gustave*, Djaman Joseph, Guessennd Nathalie, Oussou Raphael, Dindezi Rudens, Chalchat Jean Claude, Dosso Mireille And Tonzibo Felix.

Terpenes, antibacterial and modulatory antibiotic activity of essential oils from *Croton hirtus* l'hér. (euphorbiaceae) from ivory coast.

Journal of essential oil bearing plants, **2014**, 17 (4): 607-616

Touré Daouda, Kouamé Bi Koffi F. P, Bedi Gustave*, Guessennd Nathalie, Oussou Raphael J.C Chalchat, Mireille Dosso and Tonzibo F

Effect of Geographical Location on The Chemotype and Antibacterial Activities of Essential Oils from Ivoirian *Chromolaena odorata* (L) R. M. King and Robinson (Asteraceae).

Journal of pharmacy and phtyotherapy. **2014**, 6 (6): 70-78

Communication par affiche avec actes sur résumé

Touré Daouda, Kouamé Bi Koffi F. P., Bedi Gustave*, Guessennd Nathalie, Oussou Raphael J.C Chalchat, Mireille Dosso and Tonzibo F (Communication affichée)

Etude de la variabilité Géographique sur les Chemotype et Activités Antibactériennes des Huiles Essentielles *Chromolaena odorata* (L) R. M. King and Robinson (Asteraceae) de Côte d'Ivoire

1ère journées scientifiques du CMES ; 5 au 7 Décembre **2013**, Abidjan, Côte d'Ivoire (Diplôme de participation)

Full Length Research Paper

Effect of geographical location and antibacterial activities of essential oils from Ivoirian *Chromolaena odorata* (L) R. M. King & Robinson (Asteraceae)

Daouda Touré^{1,2,3}, Bi Koffi F. P Kouamé^{2,4}, Gustave Bedi^{2*}, Allico Joseph³, Nathalie Guessennd¹, Raphael Oussou^{3,4}, Jean Claude Chalchat⁵, Mireille Dosso¹ and Felix Tonzibo²

¹Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Résistances des Micro-organismes aux Anti-Infectieux, Laboratoire de Bactériologie-virologie, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Chimie Organique Biologique, UFR SSMT, 08 BP 582 Abidjan 08, Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire.

³Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Médicale, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01 Côte d'Ivoire.

⁴Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, LUNAM-CNRS UMR6230, BP 92208, 44322 Nantes, France.

⁵Laboratoire de Mathématiques Physique Chimie, UPR. BP 150 Daloa, Université Jean Lorougnon Guedé, Côte d'Ivoire.

⁶Laboratoire de chimie des Hétérocycles et des Glucides Chimie des huiles essentielles, Les Cezeaux, 63177, Aubière France.

Received 21 January, 2014; Accepted 3 June, 2014

Essential oil yield and chemical composition of fresh leaves of *Chromolaena odorata* obtained by hydro-distillation collected from five different sites in Abidjan were investigated. The chemical composition of the essential oil was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). From each locality, leaves were collected during sunny period to look for some correlation between composition and geographical variation. As a result, fifty four components were characterized, representing between all essential oil samples. From five investigated sample, all of the essential oil presented seven major components: germacrene D (15 to 20%), geigerene (14 to 17%), pregeigerene (11 to 12%), α -pinene (7 to 10%), β -caryophyllene (7 to 10%), β -pinene (4 to 5%) and δ -cadinene (3 to 5%). All essential oils considered were characterized by a clear predominance of hydrocarbon compounds chiefly sesquiterpenes (71.92 to 77.68%) and monoterpenes (15.71 to 18.38%). With only one exception, storage of the material plant, seasonal and geographical variation have no effect on the yield. Antibacterial activities of the oils from one location were tested against seven bacteria. The inhibition zones and minimum microbial concentration (MIC) for bacterial strains, which were sensitive to *C. odorata* essential oil, were in the range of 8 to 16 mm and 64 to 256 μ g/ml, respectively. The oils showed moderate activity against all tested bacteria.

Key words: *Chromolaena odorata*, essential oil, chemical composition, germacrene D, geigerene, pregeigerene, antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Chromolaena odorata (L.) King & Robins is one of the world's worst tropical weeds. It is a member of the tribe of Eupatorieae in the sunflower family Asteraceae. In traditional medicine of Ivory Coast, extracts are used as cataplasms to stop bleeding or as anti-inflammatory (Adjanohoun et al., 1981). Other medicinal uses include anti-diarrheal, astringent, antispasmodic, anti-hypertensive, diuretic, antipyretic and heart tonic (Iwu et al., 1999). The fresh leaves and extract of *C. odorata* are a traditional herbal treatment in some developing countries for burns, soft tissue wounds and skin infections (Vaisakh et al., 2012). *C. odorata* is a medicinal plant having diverse pharmacological properties, namely, anti-inflammatory (Owoyele et al., 2005; Taiwo et al., 2000), anti-microbial (Bamba et al., 1993; Chomnawang et al., 2005), anti-gonorrhoeal (Caceres et al., 1995), antipyretic, anti-spasmodic (Taiwo et al., 2000), diuretic (Gopinath et al., 2009), analgesic (Jena et al., 2010), and wound healing (Biswal et al., 1997) activities. A formulation prepared from the aqueous extract of the leaves has been licensed for clinical use in Vietnam (Vaisakh et al., 2012). The phytochemical studies have revealed the presence of chemical entities in the plant such as steroids, terpenes (Ahmad et al., 1967), flavonoids (Talapatra et al., 1977), alkaloids (Hai et al., 1995) and essential oils (Bedi et al., 2001; Bamba et al., 1993). The volatile compounds of the leaves of *C. odorata* have been previously studied from Riviera, an Easter area of Abidjan (Bedi et al., 2010), from Cameroon (Pamo et al., 2004) and Congo (Lamatal, 1992) characterized by the presence of α -pinene (8.5 to 21.2%), β -pinene (1.2 to 10.1%), geigerene (4.2 to 11.7%), pregeigerene (14.8 to 25.1%) and germacrene D (9.5%) as the major components. Another report, from Nigeria, has α -pinene (19.3%), limonene (10.2%), camphor (15.5%) and γ -cadinene (14.5%) as major constituents (Inya-agma et al., 1987). A further report from Vietnam is reported to be dominated by geigerene (42.5%) and β -cubebene (12.5%) (Nguyen et al., 1992). Recently, a study revealed that the roots of *C. odorata* from India have different compounds other than the leaves oil; the main constituents were himachalol (24.2%), 7-isopropyl-1,4-dimethyl-2-azulenol (17.6%), androencecalinol (14.1%), and 2-methoxy-6-(1-methoxy-2-propenyl) naphthalene (5.6%) (Rajesh et al., 2013). The biological activities of *C. odorata* essential oil including insecticidal (Bouda et al., 2009), insect repellent (Cui et al., 2009), antimicrobial, fungicidal (Bamba et al., 1993) cyclooxygenase function of prostaglandin-H

inhibitory (Bedi et al., 2010) and cytotoxic (Villiangiri et al., 2012) activities were investigated. Generally, the yield and composition of the oil varies, depending upon the origin, the collection period, and the growth stage of the plant (Greche et al., 1997). A study on the antimicrobial activity of different species (Van et al., 2007) indicates little variability in oils available from different sites.

The bibliography review showed that extract of *C. odorata* on the chemical composition presented monoterpenes, sesquiterpenes and oxygenated compounds. Because of its use in traditional medicine and accessibility on open area suggest that it study can be interested for human health. This constituted the major reason of this study on the fresh leaves of this plant. So, this paper reports results concerning the study of the chemical composition and the antibacterial activities of the essential oil of *C. odorata* based on the season, the temperature and the geographic location. These results can be to improve the uses of *C. odorata* in traditional medicine.

MATERIALS AND METHODS

Plant

Leaves of *C. odorata* were collected (at 8:00 am) from five locations in Abidjan during two periods of the year, according to the wet season (May-June, frequent rainfall, 20 to 25°C) and the dry (sunny) season (December-January, 30°C).

Sites considered may be grouped in the same bioclimatic zones: Cocody (Centre), Yopougon (West), Port-Bouet (South), Abobo (North) and Akouedo (East). The species were identified in the botanical centre of the University of Felix Houphouët Boigny, Ivory Coast, by Professor Ake-Assi.

At each site, 2 kg of fresh leaves that were separated in equal part of 500 g were collected and air dried at room temperature (25°C) for 6 days.

Isolation of the essential oil

Fresh leaves (500 g) were subjected to steam distillation with 850 ml of water for 2 h in a Clevenger-type apparatus. The distilled essential oil was dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and stored in tightly closed dark vial at 0°C until the time of analysis and antibacterial assays.

In order to examine the effect of storage on the leaves, the essential oil yields of each sample were compared: J₀ (first day); J₂ (two days); J₄ (four days); J₆ (six days). Each sample of leaves from each location was kept at room temperature about 25°C before undergoing steam distillation.

*Corresponding author. E-mail: bedisag@yahoo.fr. Tel: +00 225 48 86 86 67

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Analysis of the essential oils

Essential oil was investigated by gas chromatography (GC) and GC coupled with mass spectrometry (GC-MS). Concerning GC analysis, the gas phase chromatography was carried out using a Delsi DI 200 instrument equipped with a flame ionization detector and a DB5 column (25 m × 0.25 mm, df: 0.25 µm) with a split flowrate of 60 ml/min. Nitrogen was used as carrier gas; temperature programming was 5 min at 50°C and 30°C min⁻¹ up to 220°C, injector temperature was 220°C and detector temperature was 250°C. For GC-MS, the essential oil was analyzed using a Hewlett-Packard gas Chromatograph Model 6890 coupled with a Hewlett-Packard MS Model 6890 equipped with an HP5 column (30 m × 0.25 mm, df: 0.25 µm) programmed from 50°C (5 min) to 300°C at 50°C min⁻¹ and 5 min hold. The carrier gas was helium (1.0 ml/min), injection was set in the split mode (1/10). Injector and detector temperatures were 250 and 320°C, respectively. Ionization was by electron impact at 70 eV, the electron multiplier was set at 2200 V, and ion source temperature was 230°C. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the m/z range of 33 to 450. Identification of compounds was carried out by calculating retention indices (RI) or Kovát's indices (KI) and comparing mass spectra with those in data banks (Adams, 1989; Mc Lafferty and Stauffer, 1989). For quantification purpose, relative area percentages obtained by field ionization detection (FID) were used.

Antibacterial activity assay

In vitro antimicrobial activities of essential oil were evaluated by disc diffusion and a micro broth dilution method. Essential oils were tested against following microorganisms obtained from ATCC and clinical isolates: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* USSURMI 469C/12, *S. aureus* USSURMI 524C/12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 444C/12, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* USSURMI 434C/12, *Citrobacter koseri* USSURMI 745C/13 and *Enterobacter aerogenes* USSURMI 746C/13. Pure bacterial strains were obtained from Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Bacteria strains were cultured overnight at 37°C in nutrient agar (NA, Oxoid).

Disc diffusion method

In vitro antimicrobial activities of essential oil were evaluated by disc diffusion method using Mueller-Hinton Agar with determination of inhibition zones (IZ) according to the Committee of clinical laboratory standards (NCCLS, 1999). Freshly grown microbial suspensions in Mueller Hinton broth were standardized to cell density of 1.5×10^8 (McFarland 0.5). In the disc sensitivity test, three different concentrations of the oils were prepared by dissolving 10% dimethyl sulphoxide (DMSO). Disc of 6 mm diameter (BioRad) were sterilized at 121°C for 15 min. An aliquot (20 µl) of essential oil were applied onto a disc and allowed to dry. After 18 to 24 h of incubation at 37°C, diameter of growth inhibition zones were measured. Gentamicin (10 µg) and DMSO (10%) were used as positive and negative control, respectively. The results were reported as mean±standard deviation (SD) after three repeats.

Determinations of minimum inhibitory concentration (MIC)

For minimum inhibitory concentration (MIC), a micro broth dilution method in broth media Mueller-Hinton (Difco) susceptibility assay

was used. In these experiments, essential oil dissolved in Tween 80 (Merck, Germany) was first diluted to the highest concentration at the concentration 10% (v/v) in order to enhance essential oils solubility. Geometric dilutions, ranging from 0.5 to 1024 µg/ml of essential oils, were prepared in 96-well microtitre plate, volume being 100 µl. Bismaleimido-hexane (BMH) of 90 µl was added. As a final step, 10 µl of 1×10^6 UFC/ml (according to 0.5 Mc Farland turbidity standards) of standardized microorganisms suspensions were inoculated into each well. The test was performed in a volume of 200 µl with essential concentrations of 0.25 to 512 µg/ml. All tubes were incubated in air at 37°C for 24 h before being read. The same test were performed simultaneously for the grow control (Mueller-Hinton broth (MHB) + test microorganism) and sterility control (MHB + test oil). The MIC is the lowest concentration of the sample that prevented visible growth. The microorganism growth was indicated by the turbidity and a pellet on the well bottom.

RESULTS AND DISCUSSION

Yield of essential oil

The oils were obtained by hydrodistillation of fresh leaves collected from five locations. The yields of essential oils ranged between 0.13 and 0.20% by weight (Figure 1). The higher value was obtained utilizing the leaves from Cocody (0.20%), and the lower value was from samples in Abobo Te (0.13%).

Similar results were reported for essential oils of *C. odorata*; although all are a little below the maximum previously found of 0.2% (Bedi et al., 2001; Sohounhloue et al., 1996; Ayensu, 1978). Yields obtained during rainy and sunny seasons are identical, with the exception of Port-bouet-airport's site, for which a poorer yield was obtained from wet-season leaves.

Changes in yields and chemical profile may be due to storage conditions and not to either seasonal or geographical variation. In order to evaluate this, steam distillation of leaves of *C. odorata* at room temperature (25°C) (under normal day/night conditions) was carried out for different storage duration. Distillations were done with same mass of fresh leaves (500 g) and same quantity of water (850 ml).

The yields of essential oil of leaves stored at 25°C ranged in J₀ (0.09 to 0.15%), J₂ (0.07 to 0.14%), J₄ (0.03 to 0.15%) and J₆ (0.00 to 0.14%) (Figure 2). Samples of leaves from the 4 locations: Yopougon (West), Port-Bouet (South), Abobo (North) and Akouedo (East) all showed a major loss of distillable material over six days of storage. Indeed, for 2 samples none oils were recovered after 6 days. In contrast, sample from Cocody (Centre) showed negligible loss over that same 6 days period. Losses in 4 leaf samples for which oil content seemed to be sensitive to storage is likely attributed to the possible photolysis or oxidative reactions by UV (Djerrari, 1986). Another possibility is that there has been considerable volatilization during storage, probably due to

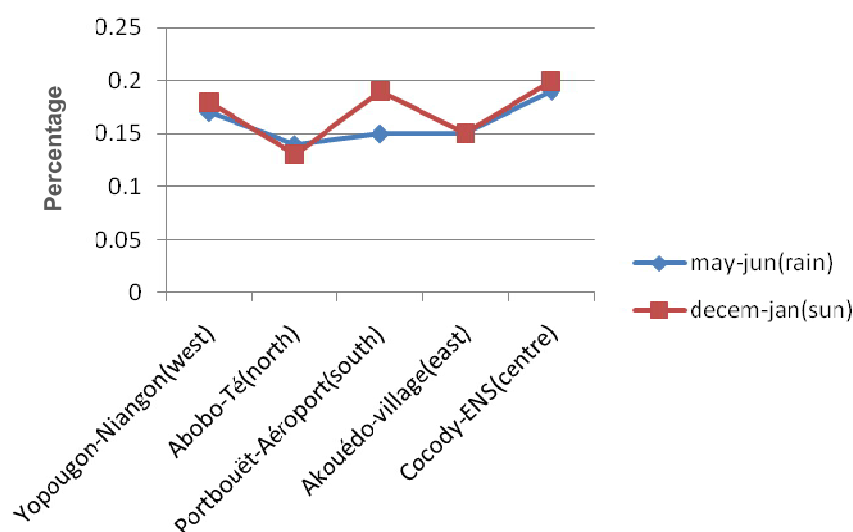


Figure 1. Yields (%) of essential oil of *Chromolaena odorata* from five locations of Abidjan City.

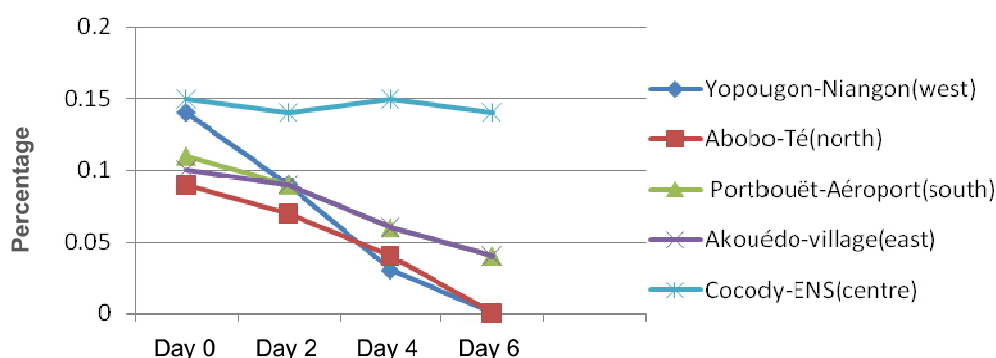


Figure 2. Yields (%) of essential oil obtained by steam distillation of leaves of *Chromolaena odorata* stored at 25°C under normal day/night conditions.

the breakdown of the storage cells. Why sample from Cocody was apparently resistant to such degradative processes remains to be established, but clearly such stability is advantageous for commercial exploitation.

Composition of the essential oils-

In total, fifty four constituents were identified and quantified in all location (Table 1). The constituents represented between 95.3 and 99.7% of the total oil content. Although bulk oil production was found relatively invariant between sample sites; geographical location might have an impact on the chemical composition of the *C. odorata* essential oil. These values show that all important products

important products presented were identified and the overall profile was found to agree with that previously reported (Bedi et al., 2001).

Notably, seven major identified components (Figure 3) were present in similar amounts: germacrene D (20%), geigerene (17%), pregeigerene (12%), α -pinene (10%), β -caryophyllene (9%), β -pinene (5%) and δ -cadinene (5%). It must therefore be concluded that only one chemotype was observed for the five examined locations. This chemotype is the same as the one obtained in Riviera (Cocody) (Bedi et al., 2001), Cameroon (Pamo et al., 2004) and Congo (Phanet, 1996). However, it differs from the two others found respectively in Nigeria (Inyanga et al., 1987) and Vietnam (Nguyen et al., 1992), in

Table 1. Components identified.

No.	KI	RI	Compound	Class	Content (% w/w)				
					Yopougon	Abobo	Akouedo	Portbouet	Cocody
1	935	939	α -pinene	HM	8.29	10.19	10.26	8.82	7.6
2	974	975	Sabinene	HM	0.95	1.14	0.96	1.03	0.91
3	979	979	β -pinene	HM	4.17	5.18	4.38	4.94	4.7
4	990	991	Myrcene	HM	1.18	1.53	0.7	0.93	0.59
5	1007	1003	α -phellandrene	HM	-	-	-	-	
6	1018	1017	α -terpinene	HM	-	-	-	-	
7	1026	1026	p-cymene	HM	-	-	-	-	0.04
8	1031	1029	Limonene	HM	0.73	0.65	1.07	1.03	0.58
9	1034	1033	1.8-cineole	OM	-	-	-	-	0.08
10	1037	1037	(Z)- β -ocimene	HM	0.4	0.29	0.22	0.27	0.17
11	1048	1050	(E)- β -ocimene	HM	2.53	1.86	1.53	1.73	1.09
12	1059	1060	γ -terpinene	HM	-	-	-	0.03	
14	1086	1089	Terpinolene	HM	-	-	-	-	0.03
15	1100	1097	Linalool	OM	0.13	0.11	0.2	0.16	0.07
16	1113	-	(E)-4.8-dimethyl-nona-1,3,7-triene	HM	0.13	0.11	-	-	-
17	1136	-	geigerene (isomer)	HS	2	2.14	1.83	1.7	1.89
18	1145	1143	Geigerene	HS	16.73	16.88	15.71	14.11	15
19	1249	-	clavukerine A	HS	0.21	0.22	0.19	0.32	0.13
20	1256	1250	isogeijerene C	HS	0.27	0.15	0.18	0.13	0.15
21	1299	1287	Pregeijerene	HS	12.12	12.29	11.41	10.68	12
22	1337	1338	δ -elemene	HS	0.32	0.26	0.38	0.19	0.24
23	1349	1351	α -cubebene	HS	0.15	0.14	0.14	0.19	0.14
24	1379	1377	α -copaene	HS	2.9	2.65	3.69	3.92	3.36
25	1384	1381	8-epi-dictamnol	OS	-	-	-	-	0.04
26	1387	1388	β -bourbonene	HS	0.4	0.11	0.19	-	0.08
27	1391	1391	β -elemene	HS	1.12	1.01	1.18	1.15	1.06
28	1425	1419	β -caryophyllene	HS	8.53	7.55	9.67	9.16	8.6
29	1434	1430	Dictamnol	OS	0.3	0.23	0.27	0.28	0.24
30	1437	1432	β -copaene	HS	0.31	0.16	1	0.89	1.7
31	1444	1437	γ -elemene	HS	0.13	0.12	0.21	0.22	0.25
32	1460	1455	α -humulene	HS	2.29	2.21	2.88	2.76	2.82
33	1475	1477	(E)-cadina-1(6),4-diene	HS	0.24	0.32	0.24	0.45	0.42
34	1479	1480	γ -muurolene	HS	0.53	0.56	0.5	0.79	0.45
35	1487	1485	germacrene-D	HS	19.97	19.24	19.64	15.29	19
36	1496	1494	murola-4(14),5-diene trans	-	0.92	1	0.77	0.96	1
37	1499	1500	Bicyclogermacrene	HS	2.35	2.15	2.59	2.39	2.61
38	1512	1509	germacrene-A	HS	0.18	0.14	-	0.19	0.34
39	1516	1514	γ -cadinene	HS	0.3	0.33	0.35	0.39	0.29
40	1521	1523	δ -cadinene	HS	3.94	4.16	4.39	5.06	3.8
41	1525	1530	Zonarene	HS	0.28	0.24	0.41	0.57	0.52
42	1536	1539	α -cadinene	HS	0.13	0.14	-	0.15	0.14
43	1551	1550	Elemol	OS	0.39	0.74	0.38	0.71	0.52
44	1561	1561	germacrene-B	HS	0.2	-	0.13	0.26	0.11
45	1564	1563	(E)-nerolidol	OS	0.29	0.26	0.43	0.34	0.37
46	1587	1583	caryophyllene oxide	OS	0.13	0.09	0.2	0.6	0.37
47	1600	1593	Viridiflorol	OS	0.34	0.32	0.24	0.29	0.52
48	1611	1608	humulene-1,2-epoxyde	OS	0.09	-	0.15	0.18	0.27

Table 1. Contd.

50	1632	1629	1-epi-cubenol	OS	0.18	0.14	0.16	0.22	0.18
51	1646	1640	epi α -cadinol	OS	0.16	0.12	0.33	0.37	0.28
52	1659	1654	α -cadinol	OS	0.41	0.66	0.49	1.05	0.41
53	1770	1760	benzoyl benzoate	OS	0.48	-	-	0.69	0.06
54	2107	-	Phytol	OS	0.1	-	-	0.13	0.06
-	-	-	Total	-	97.90	97.79	99.65	95.72	95.30

(-): Not detected.

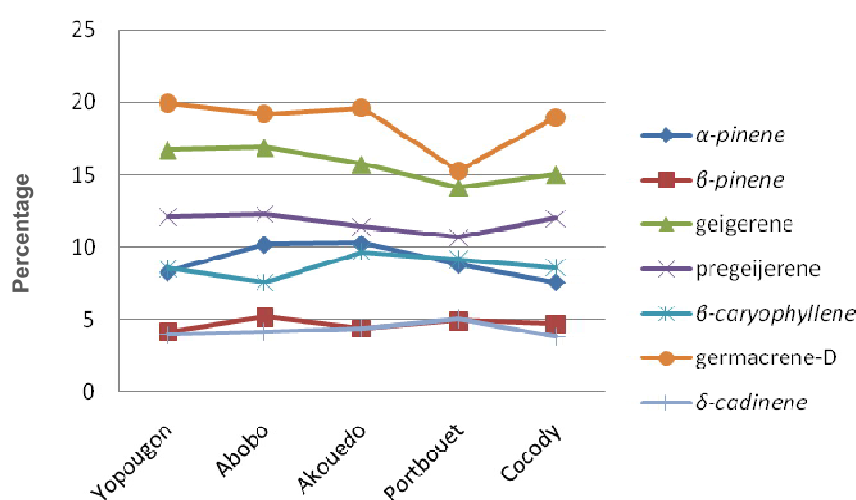


Figure 3. Percentage (averages of five sites of collection) for principal constituents of essential oil of *Chromolaena odorata*.

which α -pinene (19.3%) and geigerene (42.5%) were found to be the major products.

This result indicates that the qualitative and quantitative composition of the essential oil depends on the nature of the location in which the plant has grown. The area in the south of the Ivory Coast (Riviera) is wet and sandy. Even though collections made in Congo and Cameroon are distant, they have been harvested in coastal regions, which in lower part of the equatorial zone are subjected to the same climate. In contrast, in the case of Nigeria, and probably Vietnam, the leaves of *C. odorata* were collected far from the coasts.

Each constituent of the oils was considered belonging to a given two class: that is, sesquiterpenes (76.73 to 80.33%) and monoterpenes (0.2 to 0.15%), both hydrocarbons (90.7 to 96.8%) are oxygenated (2.67 to 5.02%). Attributions are reported in Figure 4. All essential oils considered were characterized by a clear predominance of hydrocarbon compounds chiefly sesquiterpenes and monoterpenes.

Antimicrobial activities of essential oil of sample from Cocody

Variation in the chemical profile of essential oils could influence their biological activities. Therefore, it was important to determine the chemical composition of essential oils to correlate with their antimicrobial activities (Lin et al., 2007). The qualitative and quantitative composition of the essential oil of *C. odorata* being the same on all location, antimicrobial activities of one location of Cocody were evaluated for the tests against pathogenic strains of Gram positive and Gram negative bacteria. Data on antimicrobial activity of *C. odorata* from different area are summarized in Table 2. The inhibition zone (IZ) values for bacterial strains, which were sensitive to essential oils of *C. odorata* from Cocody location, were in the range of 8.33 to 1.66 mm.

According to classification made by Rota et al. (2008), *C. odorata* essential oils showed moderate activity against *S. aureus* and *E. faecalis*, the bacteria strains

Table 2. Antibacterial activity of essential oils of *C. odorata* on some selected microorganisms.

Microorganism	Source	Zone of inhibition (mean \pm standard deviation, mm)		CMI (μ g/ml)
		Essential oil (20 μ g/disc)	STD ^b (30 μ g/disc)	Essential oil
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	13.66 \pm 0.58	35.00 \pm 1.00	128
<i>E. faecalis</i>	USSURMI 469C/13	17.66 \pm 0.58	-	128
<i>S. aureus</i>	USSURMI 524/12	13.33 \pm 0.58	63.66 \pm 0.58	64
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	12.67 \pm 1.15	22.33 \pm 1.15	256
<i>K. pneumoniae</i>	USSURMI 444C/13	10.66 \pm 0.58	26.33 \pm 1.15	> 512
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	12.00 \pm 1.00	-
<i>Shigella</i> species	USSURMI 434C/13	11.67 \pm 1.15	41.33 \pm 0.58	256
<i>C. koseri</i>	USSURMI 745C/13	10.66 \pm 0.58	27.33 \pm 0.58	> 512
<i>E. aerogenes</i>	ASSURMI 746C/13	08.33 \pm 0.58	22.33 \pm 1.15	> 512

^aASSURMI Clinical isolate from Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. ^bSTD: Gentamycine standard.

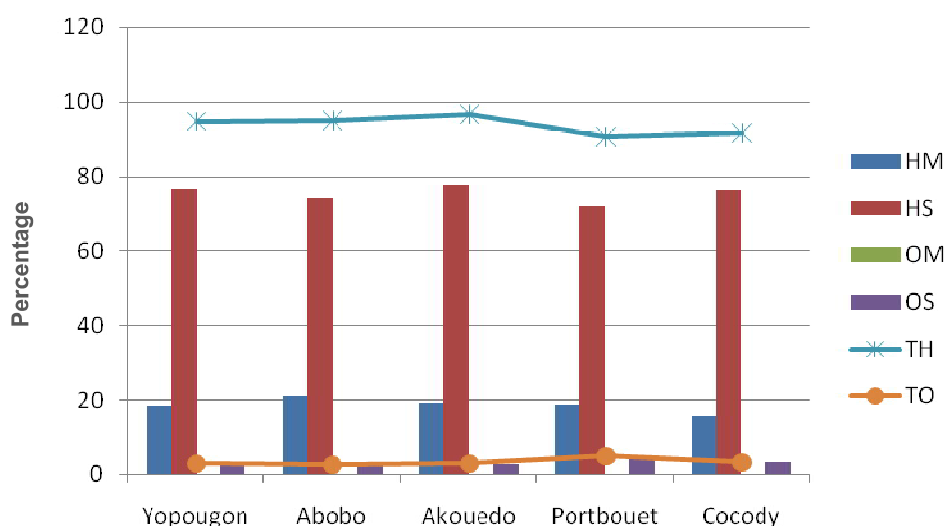


Figure 4. Percentages of principal classes characterizing the oil of *Chromolaena odorata* from five locality of Abidjan. HM: Monoterpènes hydrocarbon; HS: sesquiterpenes hydrocarbon; OM: oxygenated monoterpene; OS: oxygenated sesquiterpene; TH: total hydrocarbon; TO: total oxygenated

(IZ < 20 to 12 mm) and not active against *P. aeruginosa*. The bacteriostatic effectiveness of essential oils of *C. odorata* from Cocody location estimated by minimum inhibitory concentration (MIC) values, were in the range of 64 to 256 μ g/ml. For *K. pneumoniae*, *C. koseri*, and *E. aerogenes* strains MIC are superior to 512 μ g/ml.

The essential oils evaluated in this study presented a great variety of sesquiterpenes that could be considered as answerable for the antimicrobial activity. Although they usually occur as complex mixtures, their activity may

generally account for in terms of their major components. However, as mentioned earlier, couple geigerene/pregeigerene has shown antimicrobial and antibacterial activities (Moses et al., 2010). Both compounds are major components of the five essential oils are herein characterised. Other components, including most abundant, germacrene D, are also known for their antibacterial activity (Yang et al., 2008). The presence of these compounds could explain the known antimicrobial activity of *C. odorata* leaves. However, it should be considered that

minor and major components, as well as, possible interactions between the substances, could contribute with the antimicrobial properties.

A particularity of the chemotype from Abidjan is the production of numerous derivatives of geigerene and germacrene. In the case of geigerene, derivatives obtained are pregeigerene and isogeigerene-C, for which total amount, varies from 24 to 29%. As for germacrene, derivatives are germacrene-A, germacrene-B, germacrene-D and bicylogremacrene, for which total amount, varies from 21 to 23%. These compounds may reinforce the antimicrobial character of the oil and, indeed, these two groups of compounds constitute 50% of the total volatiles present into *C. odorata*. It now needs to be ascertained whether these compounds (constituting 50% of the total volatiles present into *C. odorata*) are likely to be responsible for antimicrobial activities.

Conclusion

Conclusively, among the samples of *C. odorata* leaf oil examined, it can be said that a seasonal and geographical variation both in yield is not pronounced, whereas geographical variability in composition has been revealed, and one chemotype has been observed. Our data support the possible use of essential oils of *C. odorata* from different locations to Abidjan, against two important pathogenic microorganisms, *S. aureus* and *E. faecalis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Professor Ake Assi (Botanical Centre of the University of Cocody) for the identification of plant species.

Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Adams RP (1989). Identification of essential oils by ion traps mass spectroscopy. Academic Press, Inc; New York.
- Adjanooun EJ, Ake AL, Floret JJ, Guinko MS, Koumare, Ahyi AMR, Raynal J (1981). Traditional Medicine and Pharmacopoeia: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Mali. Paris: Agence de Coopération Culturelle et Technique.
- Ahmad M, Nabi MN (1967). Chemical investigations on the leaves of *Eupatorium odoratum*. Sci. Res. 4:154-157.
- Ayensu ES (1978). Medicinal plant of West Africa. Algonac, Michigan. pp. 162-165.
- Bamba D, Bessiere JM, Marion C, Pelissier Y, Fouraste I (1993). Essential oil of *Eupatorium odoratum*. Planta Med. 59:184-185.
- Bedi G, Tonzibo ZF, Chalchat JC, N'Guessan YT (2001). Composition chimique des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* L. King Robinson (Asteraceae) Abidjan Côte d'Ivoire. J. Société Ouest Africaine de Chim. 11: 29-37.
- Biswal PR, Sardar KK, Parija SC, Mishra PR, Misra SN (1997). Wound healing effect of *Eupatorium odoratum* Linn. and Himax in rabbits." Ind. J. Indigenous Med. 19(1):71-74.
- Bouda H, Tapondjou LA, Fontem DA, Gumedzoe MYD (2009). Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lanatacamara* and *chromolaenaodorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 37:103-109.
- Caceres A, Menendez H, Mendez E, Cohobón E, Samayoa BE, Jauregui E, Peralta E, Carrillo G (1995). Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. J. Ethnopharmacol. 48(2):85-88.
- Cui S, Tan S, Ouyang G, Jiang S, Pawliszyn J (2009). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography- Mass Spectrometry analysis of *Eupatorium odoratum* extract as an oviposition repellent. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 877(20-21):1901-1906.
- Djerrari A (1986). Thèse de doctorat, Université de Sciences et Techniques de Languedoc. France.
- Gopinath R, Sunilson JAJ, Suraj R, Amitava D, Nilugal K (2009). Diuretic activity of *Eupatorium odoratum* Linn. J. Pharm. Res. 2:844-846.
- Greche H, Ismaili-Alaoui MM, Hajjaji N, Zrira S, Bellanger A, Benjilani B (1997). Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de *Tanacetum annuum* L. in Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles. In: Benjilali B, Ettalibi M, Ismaili-Alaoui MM, Zrira S, Actes (Eds.), Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles. I.A.V. Hassan II; Rabat Maroc. pp. 169-176.
- Hai MA, Saha K, Ahmad MU (1995). Chemical constituents of *Eupatorium odoratum* Linn. (Compositae). J. Bangladesh Chem. Soc. 8:139-142.
- Inya-Agha SI, Oguntimein BO, Sofowora A, Benjamin TV (1987). Phytochemical and antibacterial studies on the essential oil of *Eupatorium odoratum*. Int. J. Crude Drug Res. 25:49-52.
- Iwu MM, Duncan AR, Okunji CO (1999). New antimicrobials of plant origin in perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, USA. pp. 457-462.
- Jena PK, Chakraborty AK (2010). Evaluation of analgesic activity studies of various extracts of leaves of *Eupatorium Odoratum* Linn. Int. J. Pharm. Tech. 2:612-616.
- Lamat G, Menut C, Aromatic plants of tropical Central Africa IV (1992). Essential Oil of *Eupatorium odoratum* L. from Cameroon and Congo. J. Essent. Oils Res. 4:101-105.
- Lin KHYS, Lin MY, Shih MC, Yang K, Hwang SY (2007). Major chemotypes and antioxidative activity of the leaf essential oils of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh from a clonal orchard. Food Chem. 105:133-139.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB (1989). The Willey NBS Registry of Mass Spectral Data. J. Wiley & Sons, NY.
- Moses SO, Akintayo O, Kamil OY, Labunmi L, Heather EV, Jessika AT, William NS (2010). Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria. J. Nat. Prod. 4(1):72-78.
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (6th ed.) Approved standards. M2-A6, Wayne, PA.
- Nguyen XD, Le KB, Leclercq PA, Bien LK (1992). The constituents of the leaf oil of *Chromolaena odorata* (L) R. M. King & Robinson from Vietnam. J. Essent. Oils Res. 4(3):309-310.
- Ogzwella CD, Willis M (1962). Volatiles oil in cardamom seed. Okla. Acad. Sci. 43:57-60.
- Owoyele VB, Adediji JO, Soladoye AO (2005). Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*, Inflammopharmacology 13(5-6):479-484.

- Pamo TE, Amvamp HZ, Tendonkeng F, Kana JR, Fongang MD, Tapondjou LA (2004). Chemical composition and acaricidal essential oils from leaves of *Chromolaena odorata*(L.) King & Robinson and *Eucalyptus saligna* Smith effect on ticks (*Rhipicephalus lunulatus* Neumann) dwarf goat of Guineain West Cameroon. *Livest. Res. Rural Dev.* 16(9):123-127.
- Phan TT, Hughes MA, Cherry GW, Le TT, Pham HM (1996). An aqueous extract of the leaves *Chromolaena odoratum* (formerly *Eupatorium odoratum*) (eupolin) inhibits hydrated collagen lattice contraction by normal human dermal fibroblasts. *J. Altern. Complementary Med.* 2(3):335-343.
- Rajesh K Joshi (2013). Chemical Composition of the Essential oil of *Chromolaenaodorata* (L.) R. M. King & H. Rob. Roots from India. *J. Chem.* Article ID 195057.
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19:681-687.
- Sohounhloue DK, Dangou J, Djoussou LG, Gnonhossou B, Sagbo AU (1996). Chemical composition of the essential oil of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson collected in Houin (Benin) *J. Soc. Afr. Chim* 2:75-82.
- Sonboli A, Salehi P, Nejad Ebrahimi S (2005). Essential oil composition and antibacterial activity of the leave of *Stachysscht schegleevii* from Iran. *Chem. Nat. Compds.* 41(2):345-348.
- Talapatra SK, Bhar DS, Talapatra B (1977), Terpenoids and related compounds, Part XIII. Epoxylupeol, a new triterpenoid from *eupatorium odoratum*. *Ind. J. Chem.* 15B(9):806-807.
- Vaisakh MN, Pandey A (2012). The invasive weed with healing properties: a review on *Chromolaena odorata*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3(1):80-83.
- Van Vuuren SF, Viljoe AM, Zek T, Demirci B, Baer KHC (2007). Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. *South Afr. J. Bot.* 73:441-448.
- Velliangiri P, Subban R (2012). Isolation of a novel triterpene from the Essential oil of fresh leaves of *Chromolaena odorata* and its *in vitro* cytotoxic activity against HepG2 cancer cell line. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2(9): 132-136.
- Yang Y, Zhu S, Cai X, Tang L, Liu D, Huang J, Zou G (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cacalia tangutica* (Maxim.) Hand.-Mazz. *Front. Biol.* 3(4):402-407.



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ISSN Print: 0972-060X
ISSN Online: 0976-5026

Terpenes, Antibacterial and Modulatory Antibiotic Activity of Essential Oils from *Croton hirtus* L' Hér. (Euphorbiaceae) from Ivory Coast

Touré Daouda ^{1,2}, Kouamé Prevost ², Bedi Gustave ^{2*}, Djaman A. Joseph ¹,
Guessennd Nathalie ¹, Oussou Raphaël ³, Dinzedi Rubens ¹,
Chalchat Jean Claude ², Dosso Mireille ¹ and Tonzibo Felix ²

¹ Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Unité des Antibiotiques, des Substances naturelles et de la Surveillance des Résistances des Micro-organismes anti-Infectieux, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Ivory Coast

² Laboratoire de Chimie Organique Biologique, UFR SSMT, Université FELIX Houphouët Boigny, 08 BP 582 Abidjan 08, Côte d'Ivoire

³ Laboratoire de Mathématiques Physique Chimie, Université Jean Lorougnon Guedé, UPR, BP 150 Daloa, Ivory Coast

⁴ Laboratoire de chimie des Hétérocycles et des Glucides Chimie des huiles essentielles, Les Cezeaux, 63177, Aubière

Received 13 March 2014; accepted in revised form 27 May 2014

Abstract: The chemical composition, antibacterial and modulatory antibiotic activity of essential oils isolated by hydrodistillation from the aerial parts of *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) growing in Ivory Coast, were evaluated. The chemical composition was determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Essential oil contained 93.49 % of terpene derivatives (15.55 % and 77.94 %) monoterpenes and sesquiterpenes, respectively. Hydrocarbons monoterpenes (14.79 %) were prevalent compared to oxygenated monoterpenes (0.76 %). Moreover among sesquiterpenes, the hydrocarbons species were also detected in a higher percentage (74.06 %) than oxygenated (3.88 %). Three major components found were (E)-caryophyllene (31.75 %), germacrene-D (22.57%) and α -humulène (7.42 %). *In vitro* antibacterial activity was tested using diffusion disk and microdilution methods against *Escherichia coli* ATCC 29522 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Its modulatory effect combined with antibiotics gentamicin and ceftazidime was also determined. The antibacterial activity was studied by the broth microdilution method. The essential oil from *Croton hirtus*, were effective only against *S. aureus* ATCC 25922 (DD = 10.0 \pm 1.0; CMI = 512 μ g/mL). The MIC_s for gentamicin and ceftazidime, were reduced in the presence of the essential oils against *S. aureus* ATCC 25922, reduction of 64 to 16 μ g/mL and of 16 to 8 μ g/mL respectively. So, a modulatory effect of *Croton hirtus* essential oil combined with antibiotics was demonstrated and an important activity against bacterial *S. aureus*.

Key words: *Croton hirtus*; essential oil; Antibacterial activity, modulatory activity, *Staphylococcus aureus*.

Introduction

The intensive use of antibiotics has led to an increasing prevalence of multiple-drug resistant strains, and there is now an urgent need to develop

new effective antibiotic agents¹ and/or new approaches to resolve these problems². One strategy employed to overcome resistance mechanisms is the use of combinations of drugs

*Corresponding author (Bedi Gustave)

E-mail: < bedisag@yahoo.fr >

and several plant extracts, which had exhibited synergistic activity against microorganisms³. Down the ages Essential oils and other extracts of plants have evoked interest as sources of natural products. They have been screened for their potential uses as alternative remedies for the treatment of many infectious diseases⁴.

Essential oils have been shown to process antibacterial, antifungal, antiviral, insecticidal and antioxidant properties⁵⁻⁶. Some oils had been used in cancer treatment⁷. Extracts from aromatic plants, particularly essential oils, are a rich source of biologically active compounds showing antimicrobial properties⁸. Therefore, it is reasonable to expect a variety of plant compounds in these oils with specific as well as general antimicrobial activity and antibiotic potential⁹.

The genus *Croton*, belonging to the family Euphorbiaceae, consists of about 1200 species including trees, shrubs, herbs and lianas that occur in the most variable tropical ecosystems¹⁰⁻¹². It is an important pantropical lineage with several species that are employed in traditional medicine practices in Africa, Asia and South America¹³. Members of this genus are used in traditional medicine for the treatment of diabetes, high blood cholesterol levels and gastrointestinal disturbances¹⁴, as well as hepatic disturbances and weight loss¹⁵ anti-inflammatory and analgesic¹⁶. Some species such as *C. cajucara* Benth., *C. celtidifolius* Baill., or *C. eluteria* Bennett are used in traditional medicine to treat various diseases, being reported to be balsamic, digestive, hypotensive, narcotic, stomachic and tonic. It has been used to treat bronchitis, diarrhea and dysentery¹³ and also against fever and malaria¹⁷. *C. hirtus* have many bioactive secondary metabolites which include alkaloids, tannins, flavonoids, steroids, phenols, glycosides, terpenoids, anthroquinone and saponins. The volatile compounds of the leaves of *C. hirtus* have been previously studied from two locations, Teresina and Simoes located in north eastern Brazil¹⁸. In this study, the main compounds found in the oil of the leaves from *C. hirtus* collected at Simoes were spathulenol (26.7%), E-caryophyllene (10.0 %), bicyclogermacrene (9.5 %), α -cadinol (7.7 %) and cubenol (7.0 %). At

Teresina, E-caryophyllene (27.9-37.3 %), germacrene-D (6.3-33.7%), α -cadinene (7.0-16.1 %), δ -cadinene (1.8-13.5 %) and α -humulene (3.6-4.6 %) were identified as the major constituents. Pharmacologically it possesses antibacterial activity¹⁹, toxicity activity¹⁸, and muscle relaxant activity²⁰.

This paper describes the GC/MS study of the essential oils from *Croton hirtus* and evaluates the antibacterial and modulatory antibiotic activity associated with two antibiotics standard gentamicin and ceftazidime.

Experimental

Plant material

Fresh leaves of *C. hirtus* were collected in Bobia village in the west of Ivory Coast, a forest region, in December 2012. Plant materials were identified by Professor Ake Assiof the Floristic center of University of FELIX HOUPOUET BOIGNY, Cocody, Department of Botany, Ivory Coast.

Isolation of essential oils

The essential oils were isolated from fresh leaves by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus²¹. The obtained oil was dried over anhydrous sodium sulphate and, after filtration, stored at 0°C to be used for analyzing and studies.

Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)

The essential oil was investigated first by Gas chromatography (GC) and then GC coupled with Mass spectrometry (GC-MS). Concerning GC analysis, the Gas phase chromatography was carried out using a Delsi DI 200 instrument equipped with a flame ionization detector (FID) and a DB-5 Column (25 m x 0.25 mm, df: 0.25 μ m). The injector and detector temperature were kept at 220°C and 250°C respectively. Nitrogen was used as carrier gas at split flow rate of 60 mL/min; oven temperature program was 5 min. at 50°C and 30°C/min up to 220°C.

For GC-MS, the essential oil was analyzed using a Hewlett-Packard gas Chromatograph Model 6890 coupled to a Hewlett-Packard MS Model 6890 equipped with an HP-5 column (30 m x 0.25 mm df: 0.25 μ m) programmed from 50°C

(5min) to 300°C at 50°C/min and 5 min hold. The carrier gas was He (1.0 mL/min); injection was set in the split mode (1/10). Injector and detector temperatures were 250°C and 320°C, respectively. Ionization was done by electron impact at 70 eV, the electron multiplier was set at 2200 V, and ion source temperature was 230°C. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the m/z range of 33-450.

Identification of compounds was carried out by calculating Retention Indices (RI) or Koväts Indices (KI) and comparing mass spectra with those in data banks, i.e. Adams²² or Mc Lafferty and Stauffer²³. For quantification purpose, relative area percentages obtained by FID were used.

Screening for antibacterial activity and modulatory effect

Bacterial strains

Microorganisms were obtained from American Type Culture Collection. They are: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The pure bacterial strains were obtained from Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). The purity and identity were confirmed by standard bacteriological methods²⁴. Bacteria strains were cultured overnight at 37°C in Nutrient agar (NA, Oxoid).

Antibiotic used

Gentamicin (15 µg/disc) and ceftazidime (10 µg/disc) used for disc methods were purchased from BioRad, for dilution methods. Gentamicin and ceftazidime were purchased from Sigma-Aldrich.

Preparation of inoculation

Active cultures for experiments were prepared by transferring a loop-full of bacterial cells from nutrient agar slants into test tubes containing Muller Hinton broth (MHB). Then the test tubes were incubated without agitation for 3 h at 37°C. The suspension turbidity was adjusted to 0.5 McFarland turbidity standards (1×10^8 UFC/mL) with Densimat. After a dilution release, the inoculums of each bacterium were adjusted to 1×10^6 UFC/mL.

Preparation of discs with combination of standard antibiotics and essential oil

In order to determine the mutual influence of essential oil and antibiotics, *in vitro* antimicrobial activities of essential oil with standard antibiotics were evaluated by disc diffusion method using Mueller-Hinton Agar with determination of the disc diameters of zone of inhibition²⁵⁻²⁶. Freshly grown microbial suspensions in MHB were standardized to cell density of 1.5×10^8 (McFarland 0.5).

In the disc sensitivity test, oils were prepared by dissolving in dimethylsulphoxide (DMSO) (final concentration 10 % v/v). Sterile paper disc of (6 mm diameter, BioRad®) after sterilized at 121°C for 15 mn, were impregnated with 20 µL of essential oil separately and allowed. Three per plate were placed equidistant using sterile forceps. Negative controls were prepared using 20 µL of DMSO. After incubating the plates at 37°C for 24 h, the effect of the essential oil on the activity of antibiotics was observed. Synergistic effect was considered when inhibition zones = 2 mm diameter were observed surrounding disks containing the essential oil and the antibiotic. Antagonistic effect was considered when an inhibition zone of smaller diameter was observed around the disks with antibiotic and essential oil, compared to that developed by the antibiotic disks. Indifferent effect was considered when there was a zone of inhibition surrounding the disks with antibiotic and essential oil, with a diameter equal to that resulting from the application of the antibiotic alone and the results were reported as Mea SD after three repeats.

Determinations of minimum inhibitory concentration (MIC)

For minimum inhibitory concentration (MIC), a microbroth dilution method in broth media Mueller-Hinton (Difco) susceptibility assay was used. In these experiments, essential oil dissolved in Tween 80 (Merck, Germany) was first diluted to the highest concentration at the concentration 10 % (v/v) in order to enhance essential oils solubility²⁷. Geometric dilutions, ranging from 0.5 to 1024 µg/mL of essential oils, were prepared in 96-well microtitre plate, volume being 100 µL.

Then, 90 µL of MHB were added. As a final step 10 µL of 1×10^6 UFC/mL (according to 0.5 McFarland turbidity standards) of standardized microorganisms suspensions were inoculated into each well. The test was performed in a volume of 200 µL with essential concentrations of 0.25 to 512 µg/mL. Plates were incubated at 37°C for 24 h before being read. The same test were performed simultaneously for the grow control (MHB + test microorganism) and sterility control (MHB + test oil). The MIC is the lowest concentration of the sample that prevented visible growth. The microorganism growth was indicated by the turbidity and a pellet on the well bottom.

Antibiotic modifying test

In the order to determine the essential oils as modulator in the resistance of antibiotic resistance, the MIC of aminoglycosides (gentamicin) and beta lactamin (cefixime) against *S. aureus* 25953 ATCC and *E. coli* ATCC 25922 strains was determined in the presence or absence of essential oils using the microdilution tests Sub-

inhibitory concentrations (MICx1/8) in 10 % BHI were used ²⁸.

The antibiotic solutions (1000 µg/mL) were prepared in distilled water for use the same day. A volume of 100 µL of the antibiotics solution ranging from 0.0012-2.5 mg/mL (2-fold serial dilutions), was added in well containing 10 % of brain heart infusion and the 10 µL of a suspension containing 1×10^6 UFC/mL. Plates were incubated at 37°C for 24 h. the antibacterial activity was determined as described before.

Results and discussion

By Hydrodistillation the fresh leaves of *C. hirtus* yielded of the oil was 0.60 %, based on the initial weight of the plant. The yield different with the yield from leaves of *Brazilia* grown *C. Hirtus* ¹⁸. By using two chromatographic procedures, we observed that in the chemical composition, sixty components, representing 96.07 % of the oil were identified. Quantitative and qualitative analytical results by GC-MS are shown in Table 1.

The essential oil of leaves of *C. hirtus* contained

Table 1. Percentage composition of the essential oils from the aleaves of *C. hirtus*

No.	Compound	KI	Contents %
1	Heptanal	902	0.02
2	α-Pinene	934	0.02
3	Sabinene	973	0.01
4	Myrcene	989	0.04
5	p-Cymene	1025	0.04
6	Limonene	1030	0.02
7	1,8-Cineol	1033	0.07
8	(E)-β-Ocimene	1047	0.02
9	δ-Terpinene	1059	0.05
10	Linalol	1099	0.03
11	Hitrienol	1103	0.12
12	4,8-Dimethyl-nona-1,3,7-triene E	1113	0.10
13	1-Ethyl-4-methoxybenzene	1154	0.03
14	α-Terpineol	1196	0.02
15	Safranal	1200	0.03
16	Nerol	1224	0.01
17	Thymol	1290	0.36
18	α-Cubebene	1352	0.07
19	silphin-1-ene	1358	0.42
20	Acetate de neryle	1364	0.02
21	Cyclosativene	1372	0.34

table 1. (continued).

No.	Compound	KI	Contents %
22	α -Copaene	1379	2.16
23	β -Bourbonene	1387	3.09
24	β -Elemene	1392	6.19
25	(E)-Caryophyllene	1428	31.75
26	β -Copaene	1431	0.18
27	δ -Elemene	1434	0.52
28	Isogermacrene	1448	0.52
29	Brasila-1(6),5(10)-diene	1458	0.46
30	α -Humulene	1461	7.42
31	6-Demethoxy-ageratochromene	1464	1.15
32	δ -Muurolene	1479	1.24
33	Germacrene-D	1488	22.57
34	β -Selinene	1494	0.44
35	Valencene	1496	0.93
36	Bicyclogermacrene	1499	2.68
37	α -Muurolene	1503	0.5
38	Germacrene-A	1512	1.17
39	δ -Cadinene	1516	0.15
40	7- <i>epi</i> - α -Selinene	1520	1.59
41	δ -Cadinene	1524	0.32
42	Cadina-1,4-diene trans	1535	0.06
43	7- <i>epi</i> - <i>cis</i> -Dracunculifolol	1544	0.13
44	Elemol	1550	0.10
45	Nerolidol E	1561	0.44
46	Germacrene-B	1564	1.37
47	Germacrene-D-4-ol	1572	0.06
48	Spathulenol	1581	1.02
49	Caryophyllene oxyde	1587	1.87
50	Humulene-epoxyde II	1614	0.36
51	1,10-Diepicubenol	1619	0.15
52	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1624	0.08
53	δ -Eudesmol	1637	0.18
54	Caryophylla-4(14),8(15)-diene-5- δ -ol	1641	0.30
55	<i>epi</i> - α -Cadinol	1645	0.45
56	α -Cadinol	1659	1.25
57	Eudesma-4(15),7-diene-1- δ -ol	1687	0.27
58	6,10,14-Trimethyl-penta decan-2-one	1839	0.07
59	Phytol	2106	0.54
60	Phytolacetate	2210	0.5
	Monoterpene hydrocarbons		14.79
	Monoterpene oxygenated		0.76
	Sesquiterpene hydrocarbons		74.06
	Sesquiterpene oxygenated		3.88
	Others		2.58
	Total identified		96.07

93.49 % of terpene derivatives, corresponding to 15.55 % and 77.94 % monoterpenes and sesquiterpenes, respectively. Hydrocarbons monoterpenes (14.79 %) were prevalent compared to oxygenated monoterpenes (0.76 %). Moreover among sesquiterpenes, the hydrocarbons species were also detected in a higher percentage (74.06 %) than oxygenated (3.88 %). The major components were three sesquiterpenes (E)-caryophyllene (31.75 %), germacrene-D (22.57 %) and α -humulene (7.42 %).

Bracho and Crowley²⁹ initially suggested that the co-occurrence of α/β -pinene might be a characteristic of the *Croton* spp. show that the β -caryophyllene and linalool appear to be equally frequent as major constituent in the essential oil of many croton species. Event few studies of the chemical composition has not been published yet, recently, Radulovic *et al.*³⁰ studied the composition of the essential oil of *C. antanosiensis*, *C. decaryi*, *C. skamaliensis* from Madagascar, which are the same genus³¹.

For the main constituents in the essential oil from leaves of *C. hirtus*, the concentration observed of (E)-caryophyllene and germacrene-D was similar to those obtained at Brazilia¹⁸. However, the presence of α -humulene as main constituent has not been reported. De Lima *et al.*¹⁸, have reported a different chemotype that the main compounds found in the oil of the leaves from *C. hirtus* collected at Simoes, were spathulenol (26.7 %), E-caryophyllene (10.0 %), bicyclogermacrene (9.5 %), α -cadinol (7.7 %) and cubenol (7.0 %).

The chemical composition of *C. hirtus* showed major compounds as sesquiterpens. We founded intresseting to present here the antibacterial activity of theses essential oil.

Zone of inhibition in the absence and presence of essential oil of *C. hirtus* determined by disc diffusion methods are reported in Table 2. Essential oil of *C. hirtus* were effective only against *S. aureus*, giving a zone of inhibition of 10.0 ± 1.0 mm. Antibiotics, centamicin and ceftazidime alone inhibited *S. aureus*, giving the zone of 28.7 ± 0.6 mm and 19.7 ± 0.6 mm. However association gentamicin + essential oil and ceftazidime + essential oil inhibited *S. aureus*, giving the zone respectly of 35.7 ± 1.2 mm and 24.3 ± 0.6 mm. Thus, synergistic interaction was observed between *C. hirtus* essential oil and the antibiotics standard gentamicin (24.39 %) and ceftazidime (23.35 %) on *S. aureus* by disc diffusion methods.

Minimal inhibitory concentration (MIC) values of antibiotics in the absence and presence of essential oil of *C. hirtus* by microdilution methods are reported in Table 3. The antibacterial activity of essential oils verified that *S. aureus* ATCC 25922 (MICs 512 μ g/mL) had greater sensitivity. The essential oils showed weak antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25923 strains (MICs >512 μ g/mL). The MICs of the antibiotics towards the bacteria strains were in the range of 64 to 128 μ g/mL. The MICs for all antibiotics were reduced in the presence of the essential oils on against *S. aureus*. Essential oils of *C. hitrus* don't interfere with all drugs against *E. coli*. The

Table 2. Antimicrobial activity of *Crotonhirtus* essential oil

Microorganisms	Zone of Inhibition (mean \pm standard deviation, mm)					
	A	B		C		Increase
		GM 15	CAZ 10	GM 30	CAZ 10	GM 15 CAZ 10
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.0 ± 1.0	28.7 ± 0.6	19.7 ± 0.6	35.7 ± 1.2	24.3 ± 0.6	(24.39%) (23.35%)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	No zone	22.3 ± 0.6	22.3 ± 0.6	22.3 ± 1.2	22.7 ± 0.6	(00 %) (00 %)

A: Inhibition zones that occurred with essential oil of *C.hirtus* (20 μ l/disc)

B: Inhibition zones that occurred with standard antibiotic disc, Gentamicin (GM15) and ceftazidine (CAZ10)

C: Inhibition zones that expected to occurred when essential oil and standard antibiotic were used together, Gentamicin (GM15) and ceftazidine (CAZ10)

Table 3. Antibacterial of essential oils from *C. hirtus* in presence and absence of antibiotics, given as minimal inhibitory concentration (MIC, µg/mL)

Antibiotics	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	MIC alone	MIC combined EOCH 64 µg/ml	MIC alone	MIC combined EOCH 64 µg/ml
HE	>512	ND	512	ND
Gentamicin	32	32	64	16
Ceftazidime	0.5	0.5	16	8

most pronounced effects were obtained with the essential oil + gentamicin against *S. aureus* with MIC reduction of 64 to 16 µg/mL, while essential oil + ceftazidime against *S. aureus* reduce MIC of 16 to 8 µg/mL. The control DMSO showed a MIC ≥ 1024 µg/mL and no modifying antibiotic activity. A synergistic effect between *C. hirtus* essential oils and antibiotics standards gentamicin and ceftazidime was observed against *S. aureus*. It is known that, essential oils may interact with and affect the plasma membrane, interfering with respiratory chain activity and energy production³². The mechanisms by which essential oils can inhibit microorganisms involve different modes of action and in part may be due to their hydrophobicity³³. Some research works show that essential oils demonstrated synergism with antibiotics by direct contact³⁴.

Antimicrobial activity of *C. hirtus* essential oils was more pronounced against Gram-positive than against Gram-negative bacteria, this observation derived from studies with essential oils from many other spices³⁵. This generally higher resistance among Gram-negative bacteria could be ascribed to the presence of their outer phospholipidic membrane, almost impermeable to lipophilic compounds³⁶. The absence of this barrier in Gram-positive bacteria allows the direct contact of the essential oils hydrophobic constituents with the phospholipid bilayer of the cell membrane, where they bring about their effect, causing either an increase of ion permeability and leakage of vital intracellular constituents, or impairment of the bacterial enzyme systems³⁷⁻³⁸.

(E)-caryophyllene is a sesquiterpene widely distributed in essential oils of various plants; it has been commonly used as a fragrance chemical

since 1930³⁹. It is used in spice blends, citrus flavors, soaps, detergents, creams and lotions, and in a variety of food products and beverages. Several biological activities are attributed to (E)-caryophyllene, such as anti-inflammatory, antibiotic, antioxidant, anticarcinogenic and local anaesthetic activities⁴⁰. Recently, Gertsch *et al.*⁴¹ showed that this compound selectively binds to the cannabinoid receptor type 2 (CB2), but not to type 1 (CB1), leading to cellular activation and anti-inflammatory effects. Although the CB1 receptor is responsible for the psychomodulatory effects of cannabinoids agonists, activation of the CB2 receptor is a potential therapeutic strategy for the treatment of inflammation, pain, atherosclerosis, and osteoporosis. The investigated plants become potential alternative source of these bioactive compounds. In addition, germacrene D is known to have a strong effect on behavior⁴² and has significant antibacterial and antifungal activities⁴³. Therefore, essential oils always representing a complex mixture of different chemical components, thus it is very difficult to reduce the antibacterial effect of the total to a few active principles. Some active components (monoterpenes and sesquiterpene) found in the essential oil of *C. adenocalyx*, particularly α -humulene and β -caryophyllene, process anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties¹⁰. Germacrene is known for its antimicrobial activity⁴⁴.

Conclusion

The results of this study indicate that essential oils of *Croton hirtus* from Ivory Coast are characterized by three major components: (E)-caryophyllene, germacrene-D and α -humulene.

This results seem to be the first chemotype composition of essential oil in this country.. developing drugs when combining the natural product and antibiotics to combat the bacterial infectious agent.

The combination of essential oils and known antibiotics offers significant potential of the

References

1. **Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fischer, N.H. (2001).** Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Medica*. 67(8): 685-694.
2. **Liu, IX., Durham, D.G., Richards, R.M., Baicalin (2000).** Synergy with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* other β -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 52: 361-366.
3. **Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15(8): 639-652.
4. **Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, M., Polissiou, M., Sokmen, A. (2004).** *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1132-1137.
5. **Burt, S.A. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
6. **Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. (2005).** Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 9452-9458.
7. **Milheu, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallie, M., Bastide, J., Pelissier, Y., Bessiere, J. (1997).** *In vitro* antimicrobial activity of eight essential oils. *J.Essent.Oil Research*. 9: 329-333.
8. **Sylvestre, M., Pichette A., Longtin, A., Nagau F., Legault, J. (2006).** Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*. 103: 99-102.
9. **Darokar, M.P., Mathur, A., Dwivedi, S., Bhalla, R., Khanuja, S.P.S., Kumar, S. (1998).** Detection of antibacterial activity in the floral petals of some higher plants. *Current Science*. 75: 187-189.
10. **Santos, F.A. and Rao, V.S. (2000).** Anti-inflammatory and Antinociceptive Effects of 1,8-Cineole, a Terpenoid Oxide Present in Many Plant Essential Oils. *Phytotherapy Research*. 14: 240-244.
11. **Secco, R.S (1992).** Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Bot.* 8: 265-281.
12. **Govaerts, R., Frodin, D.G., Radcliffe-Smith, A. (2000).** Euphorbiaceae: croton to excoecariopsis. In: *World Checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae)*, vol. 2. Royal Botanic Gardens, Kew.
13. **Salatino, A., Salatino, M.L.F., Negri, G. (2007).** Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*. 18(1): 11-33.
14. **Campos, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C. (2002).** Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia*. 73(2): 116-120.
15. **Grassi-Kassisse, D.M., Wolf-Nunes, V., Miotto, A.M., FariasSilva, E., Souza-Brito, A.R.M., Nunes, D.S., SpadariBratfisch, R.C.J. (2003).** Sensitivity to β -adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharm. and Pharmacol.* 55(2): 253-257.
16. **Suárez, A.I., Compagnone, R.S., Salazar-Bookaman, M.M., Tillet, S., Delle Monache, F., Di Giulio, C., Bruges, G.J. (2003).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo*

- bark aqueous extract. *Ethnopharmacol. Journal of Ethnopharmacology*. 88(1): 11-14.
17. **Vigor, C., Fabre, N., Fourasté, I., Moulis, C. (2001).** Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. *Phytochemistry*. 57(8): 1209-1212.
 18. **De Lima, S.G., Medeiros, L.B.P., Cunha, C.N.L.C., Silva, D.D., de Andrade, N.C., Neto, J.M. Moita., Lopes, J.A.D., Steffen, R.A., Araújo, B.Q., Reis, F., De A.M. (2012).** Chemical composition of essential oils of *Croton hirtus* L'Her from Piauí (Brazil). *J. Essent. Oil Research*. 24(4): 371-376.
 19. **Subin, M.P. and Reghu, N. (2012).** Phytochemical Screening and Antibacterial Properties of *Croton hirtus* L'Her. *Plant Against Some Important Pathogenic Bacteria. Nature, Environment and Pollution Technology*. 11(1): 59-64.
 20. **Arya Moussa, A.G. (1995).** Effets comparés de l'extrait méthanolique de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) et du lanatoside C sur l'activité des muscles cardiaque et utérin. Thèse de Doctorat de Spécialité. Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire.
 21. **Kouame, B.F.P., Bedi, G., Koffi, A.M., Chalchat, J.C., and N'Guessan, T.Y. (2010).** Volatiles Constituents from Leaves of *Morinda morindoïdes* (Rubiaceae): A Medicinal Plant from the Ivory Coast .*The Open Natural Products Journal*. 3: 6-9.
 22. **Adams, R.P. (1989).** Identification of essential oils by ion traps mass spectroscopy. New York, Inc: Academic Press
 23. **Mc Lafferty, F.W and Stauffer, D.B (1989).** The Willey NBS Registry of Mass Spectral Data, J. Wiley and Son, NY.
 24. **Feron, A. (1994).** Medical bacteriology. 15 Edi. C et R. pp.
 25. **Meena, M.R. and Sethi, V. (1994).** Antimicrobial activity of essential oils from spices. *J. food Science and technology*. 31: 68-70.
 26. **Rota, C., Carraminana J.J., Burillo J. and Herrera A. (2004).** *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected food borne pathogen. *J. of food protection*. 67: 1252-1256.
 27. **Oussou K. R., Yolou, S., Boti, J.B., Kouadio Guessennd N., Kanko C., Ahibo, C. and Casanova J. (2008).** Etude Chimique et Activité Antidiarrheique des Huiles essentielles de deux Plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne; *European Journal of Scientific Research*. 24 (1): 94-103.
 28. **Vidal, C.A.S., Sousa, E.O., Rodrigues, F.F.G., Campos, A.R. Lacerda, S.R. and Costa J.G.M. (2012).** Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *octoblepharum albidum* hedw (calymperaceae). *Archives of Biological Science Belgrade*. 2: 465-470.
 29. **Bracho, R. and Crowley, K.J. (1966).** The essential oils of some Venezuelan *Croton* species. *Phytochemistry*. 5: 921-926.
 30. **Radulovic, N., Mananjarasoa, E., Harinantenaina, L., Yoshinori, A. (2006).** Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34: 648-653.
 31. **Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGrimpsy, J.A., Smallûeld, B.M. (1999).** Essential oil from Dalmation sage (*Salvia officinalis* L.). variations among individuals, plant parts, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2048-2054.
 32. **Santos, N.K.A, Coutinho, H.D.M., Viana, G.S.B., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M. (2011).** Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanill osmopsis arborea*. *Medicinal Chemistry Research*. 20: 637-641.
 33. **Coutinho, H.D.M., Rodrigues, F.F.G., Nascimento, E.M.M., Costa, J.G.M., Falcao-Silva, V.S. and Siqueira-J'unior, J.P. (2011).** "Synergism of gentamicin and norfloxacin with the

- volatile compounds of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae),” J. Essent.Oil Research. 23(2): 24-28.
34. **Jedlickova, Z., Mottl, O. and Sery V. (1992).** “Antibacterial properties of the Vietnamese Cajeput oil and Ocimum oil in combination with antibacterial agents,” Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology & Immunology. 36(3): 303-309.
 35. **Nostro, A., Germano, M.P., D Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology. 30: 379-384
 36. **Nikaido, H., and Vaara, M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological Reviews. 49: 1-32.
 37. **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12: 564-582.
 38. **Wendakoon C.N. and Sakaguchi, M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. J. Food Prot. 58(3): 280-283.
 39. **Opdyke, D.L.J. (1973).** Food and Cosmetics Toxicol. 11: 1059.
 40. **Legault, J. and Pichette, A. (2007).** Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 59(12): 1643-1647.
 41. **Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.Z., Xie, X.Q., Altmann, K.H., Karsak, M., Zimmer, A. (2008).** β -caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
 42. **Picaud, S., Olsson, M.E., Brodelius, M., Brodelius, P.E. (2006).** Cloning, expression, purification and characterization of recombinant (+)- germacrene D synthase from *Zingiber officinale*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 452: 17-28.
 43. **Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M. (2004).** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15: 549-557.
 44. **Silva, L., Oniki G.H., Agripino, D.G., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M., Mayworm, M.A.S., Ladeira, A.M. (2007).** Bicyclogermacrene, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). Brazilian Journal of Pharmacognosy. 17: 361-367.

ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE

Résumé : La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation. Face à cela la recherche de composés antimicrobiens est plus que jamais d'actualité. Les plantes constituent une source potentielle de ces composés. La présente étude décrit l'étude de la composition chimique et l'activité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* (Asteraceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) et *Cardiospermum grandiflorum* (Sapindaceae) quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger ont été analysées par GC et GC-SM. Les résultats montrent que le précocène I est constituant majoritaire des fleurs (58,78%) et des tiges (76,46%) de *A. conyzoides*. Les huiles essentielles des feuilles de *C. hirtus* sont formées en majorité par (E)-caryophyllène (31,75%), germacrène-D (22,57%) et -humulène (7,42%) alors que les tiges sont constituées en majorité de (E)-caryophyllène (37,72%), -humulène (9,64%) et l'oxyde de caryophyllène (6,95%). Enfin, les constituants les plus importants des parties aériennes de *C. grandiflorum* sont : -caryophyllène (17,09%), (E)-farnesène (11,35%), germacrène-D (11,97%) et -himachalène (14,86%). L'activité antibactérienne des huiles a été évaluée *in vitro* sur 15 bactéries. Les huiles se sont avérées antibactériennes, en outre celles de *C. odorata* étaient les plus actives. Par la suite, l'huile de *C. odorata* a été fractionnée en utilisant un éluant de polarité croissante pour être ensuite testée *in vitro* sur 10 bactéries. Les fractions oxygénées éluées avec le mélange hexane/acétate d'éthyle et surtout celle éluée avec l'acétate d'éthyle constituent les fractions les plus actives. L'interaction entre l'huile essentielle de *Croton hirtus* et deux antibiotiques a été évaluée. La combinaison de l'huile avec la gentamicine et la ceftazidime réduit considérablement la CMI sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. D'autre part, l'activité antioxydante des huiles a été étudiée en utilisant deux différents tests puis comparée avec la vitamine C. Les résultats ont montré que les huiles possèdent une activité antioxydante, l'huile de *C. grandiflorum* a par ailleurs présenté l'activité la plus élevée par les tests de radical DPPH ($CI_{50} = 0,95 \mu\text{g/mL}$) et du fer ($CI_{50} = 0,67 \mu\text{g/mL}$). Ce travail démontre que l'amélioration des activités biologiques des plantes par des études phytochimiques et biologiques contrôlées peut être un élément à la contribution de leur valorisation.

Mots clés : Huiles essentielles, Composition chimique, Activité antibactérienne, Activité antioxydante, Côte d'Ivoire

CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES OF ESSENTIAL OILS OF FOUR MEDICINAL AROMATIC PLANTS OF IVORY COAST

Abstract : Bacterial resistance to antibiotics has become a real concern. Faced with this, research antimicrobial compounds is more relevant than ever. The plants are a potential source of these compounds. The present study describes the chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of *Chromolaena odorata* (Asteraceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) and *Cardiospermum grandiflorum* (Sapindaceae) essential oils of four aromatics and medicinal plants from Ivory Coast. The essential oil was isolated by hydrodistillation using a Clevenger modified apparatus, and the identification and quantification of constituents, through GC and GC/MS analysis. The results indicate that, precocene I was the majority constituents of flowers (58.78%) and stems (76.46%) of *A. conyzoides*. The essential oils of leaves of *C. hirtus*, are formed mainly by (E)-caryophyllene (31.75%), germacrene-D (22.57%) and -humulene (7.42%) while stems are constituted mainly of (E)-caryophyllène (37.72%), -humulène (9.64%) and oxide of caryophyllène (6.95%). In the end, the majority constituents found in aerial part of *C. grandiflorum*, were : -caryophyllène (17.09%), (E)-farnesene (11.35%), germacrène-D (11.97%) et -himachalène (14.86%). The antibacterial activity of oils, have been later tested *in vitro* against 15 bacterium. The tested essential oils showed antibacterial activity, however *C. odorata* was the most active. Thereafter, oils of *C. odorata* were fractionated on an open silica column using an eluent of increasing polarity. The *C. odorata*'s oil and its chromatographic fractions were tested *in vitro* against 10 bacterium. The oxygenated fractions eluted with hexane/ ethyl acetate mix and mainly this eluted with ethyl acetate were the most active fraction. The interaction of *C. grandiflorum* essential oil with antibiotics was assessed. A combination of oil with gentamicin or ceftazidim produced a substantial reduction of the MIC against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. On the other hand, the essentials oils were investigated for its antioxidant activities using two different tests then compared with Vitamin C. Results showed that oils possess antioxidant activity, *C. grandiflorum* oil exhibit a higher activity for DPPH ($CI_{50} = 0.95 \mu\text{g/mL}$) and reducing power ($CI_{50} = 0.67 \mu\text{g/mL}$). This work demonstrates that the improved biological activities of plants by phytochemical and biological studies controlled may be an element of the contribution of their evaluation.

Keywords : Essential oils, chemical Compound, Antibacterial Activity, Antioxidant Activity, Ivory Coast